



**CLÁUDIA SOFIA
BARRETO
CANTADEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES
DE CARBAPENEMASES E/OU RESISTENTES À
COLISTINA**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**CLÁUDIA SOFIA
BARRETO
CANTADEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES
DE CARBAPENEMASES E/OU RESISTENTES À
COLISTINA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação da Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia e Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

Ao meu melhor amigo, Fábio Alexandre Santos Oliveira, que descanse em paz!

O júri

Presidente

Doutora Isabel da Silva Henriques
Equiparada a Investigadora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Tânia Isabel Sousa Caetano
Professora Auxiliar Convidada da Universidade de Aveiro

Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva
Professora Auxiliar da Universidade de Coimbra

Agradecimentos

O sucesso de qualquer trabalho requer o envolvimento de todas as pessoas que nos rodeiam, por isso gostaria de agradecer a todos os que contribuíram para os meus estudos.

Para a Doutora Sónia Mendo (Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro), minha orientadora interna de mestrado, agradeço pela valiosa assistência prestada, desde a fase inicial na escolha do projeto.

Agradecimentos especiais à supervisão da Doutora Gabriela Jorge da Silva (Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra) pela aceitação de me juntar à sua investigação e por toda a assistência prestada durante o período de pesquisa científica, incluindo a revisão de todo o trabalho.

Para a minha mãe, Dulcina de Jesus Barreto, e pai, Joaquim Manuel Ferreira Cantadeiro, obrigado por todo o apoio prestado durante o decurso do mestrado, bem como a contribuição financeira prestada.

Agradeço também à Doutora Sara Domingues (Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra), Técnica Sandra Ferreira (Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra) e aos colegas de laboratório Ana Lúcia Marques, Sónia Lopes, Alice Jacob e Vasco Lopes pelo apoio e amizade durante o período de investigação no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Palavras-chave

Klebsiella pneumoniae, resistência aos antibióticos, β -lactamases, carbapenemos, colistina, OXA-48, KPC, *mcr*

Resumo

A emergência e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos é um problema global e representa uma enorme ameaça para a saúde pública. A emergência da resistência aos antibióticos β -lactâmicos, incluindo carbapenemos, e à colistina, uma das últimas opções de tratamento, tem contribuído para a limitação da terapêutica anti-infecciosa. A vigilância epidemiológica, com detecção e caracterização dos determinantes de resistência, constitui uma ferramenta importante para o tratamento dos pacientes e melhoramento das medidas de controlo de infeções.

O estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemases e/ou resistentes à colistina de pacientes admitidos no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) e Centro Hospitalar Médio Tejo (CHMT), de 2016 e 2017. A suscetibilidade aos antibióticos e a pesquisa fenotípica de β -lactamases foram determinadas pelo método de disco de difusão. A PCR convencional foi usada para detecção de genes que codificam as β -lactamases e resistência à colistina e para a tipagem dos plasmídeos, enquanto a relação clonal dos isolados foi determinada com recurso à técnica de MLST. Os ensaios de conjugação foram realizados para avaliar o potencial de transferências dos genes de resistência entre bactérias.

Foram analisados 28 isolados de *K. pneumoniae*, sendo a maioria de urina 50% (14/28) e do Serviço de Urgência. Foi observada uma alta taxa de resistência aos β -lactâmicos associada à produção de β -lactamases. Foram detetadas as carbapenemases OXA-48 em 37.5% (3/8) e KPC em 12.5% (1/8) dos isolados, e observou-se uma alta prevalência de ESBL do tipo SHV, CTX-M e TEM nestes isolados. Este estudo descreve a primeira identificação no CHUC e CHMT de OXA-181, uma variante da carbapenemase OXA-48, e confirma a disseminação de KPC-3 em isolados de *K. pneumoniae*. Não foi possível a identificação do grupo de incompatibilidade de plasmídeos mesmo nos isolados com plasmídeos conjugativos. O MLST mostrou três diferentes perfis: ST15, ST17 e ST348.

Os genes *mcr-1* a -5, não foram detetados nos isolados resistentes à colistina sendo que a inativação de *mgrB*, um gene cromossomal envolvido na síntese do lipopolissacarídeo, foi detetada em 25% (6/24) dos isolados resistentes à colistina.

Uma contínua vigilância da suscetibilidade aos antibióticos, com caracterização molecular de resistência, e uso racional dos antibióticos é necessária para melhorar o tratamento dos pacientes e para o controlo das infeções.

Keywords

Klebsiella pneumoniae, antibiotic resistance, β -lactamases, carbapenems, colistin, OXA-48, KPC, *mcr*

Abstract

The emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria is a global problem and represent a major threat to public health. The emergence of antibiotic resistance to β -lactam antibiotics, including carbapenems, and to colistin, one of the last resource treatment options, has contributed to the limitation of anti-infective therapeutics. Epidemiological surveillance, with detection and characterization of resistance determinants, is an important tool for the treatment of patients and improvement of infection control measures.

The present study aimed to characterize genetically *Klebsiella pneumoniae* isolates producing carbapenemases and/or resistant to colistin from patients admitted into the Hospital Centre of the University of Coimbra (CHUC) and Hospital of Médio Tejo (CHMT), from 2016 and 2017. The antibiotic susceptibility and phenotypic screen of β -lactamases were evaluated by the disk diffusion method. PCR was used for detection of genes encoding the β -lactamases and resistance to colistin and for typing plasmids, while the clonal relationship between isolates was determined using the MLST technique. The conjugation assays were done to evaluate the potential of gene transfer of the resistance genes among the bacteria.

Twenty eight *K. pneumoniae* isolates were analyzed, most being from urine samples (50%) (14/28) and Emergency Service. It was observed a high rate of resistance to β -lactam antibiotics associated with β -lactamase production. OXA-48 carbapenemase was detected in 37.5% (3/8) and KPC in 12.5% (1/8) of the isolates, and there was a high prevalence of the ESBL types SHV, CTX-M and TEM, in these isolates. This study describes the first identification, in CHUC and CHMT, of OXA-181, a variant of OXA-48, and confirms the spread of KPC-3 in isolates of *K. pneumoniae*. It was not possible to identify the incompatibility group of plasmids even in isolates with conjugative plasmids. The MLST showed three different profiles: ST15, ST17 and ST348.

The genes *mcr-1* to *-5* were not detected in the isolates resistant to colistin and the inactivation of *mgtB*, a gene involved in the cromossomal synthesis of lipopolysaccharide, was detected in 25% (6/24) of the isolates resistant to colistin.

A continuous surveillance of susceptibility to antibiotics, within molecular characterization of the resistance, and rational use of antibiotics are necessary to improve the treatment of patients and for the control of infections.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico
AMC – Amoxicilina e Ácido Clavulânico
AmpC – *Ampicillinase C*
CAZ – Ceftazidima
CHMT – Centro Hospitalar Médio Tejo
CHUC – Centro Hospital de Universitário de Coimbra
CL – Colistina
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
Col-R – Resistente à Colistina
CTX – Cefotaxima
CTX-M – Cefotaximase
DDST – Teste de Sinergia de Disco Duplo
ECDC - *European Center for Disease Prevention and Control*
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ESBL – β -Lactamase de Espectro Alargado
EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
ETP – Ertapenemo
HGT – Transferência Horizontal de Genes
IMP – Imipenemase
Inc – Incompatibilidade
IPM – Imipenemo
kb – quilo-base
KPC – *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
KPC-KP – *Klebsiella Pneumoniae* Produtoras de Carbapenemases
L-ara4N – 4-amino-4-desoxi-L-arabinose
LPS – Lipopolissacarídeo
MBL – Metallo- β -Lactamases
mcr – *mobilized colistin resistance*
MDR – Resistente a Múltiplos Antibióticos
ME – Membrana Externa
MER - Meropenemo
MGE – Elementos Genéticos Móveis
MH – Mueller Hinton
MHT – Teste de Hodge Modificado
MLST – *Multi-Locus Sequence Typing*
NDM – Nova Deli Metallo-beta-lactamase
OMS – Organização Mundial de Saúde
OXA – Oxacillinase
pb – pares de bases

PBP – Proteínas de Ligação à Penicilina
PBRT – Tipagem de Replicões Baseados em PCR
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PetN – Fosfoetanolamina
RE – Enzima de Restrição
SHV – *Sulphydryl Variable*
ST – Tipo de Sequência
TBS – Caldo Trypticase de Soja
TEM – *Timoniera*
TSA – Trypticase de Soja Agar
UTI – Infecção do Trato Urinário
UV – Ultra-violeta
VIM – *Verona Integron Metallo Beta-lactamase*
XDR – “extremamente resistentes”

FIGURAS / IMAGENS

Figura 1: Amostras clínicas de onde foram identificados 28 isolados <i>K. pneumoniae</i>	35
Figura 2: Distribuição das diferentes enfermarias hospitalares dos 28 isolados de <i>K. pneumoniae</i>	36
Figura 3: Repicagem de um isolado <i>K. pneumoniae</i> em meio TSA.....	37
Figura 4: Antibiograma de um isolado <i>K. pneumoniae</i> por método de Kirby-Bauer.....	38
Figura 5: Perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos 28 isolados <i>K. pneumoniae</i>	39
Figura 6: Antibiograma ilustrando um isolado <i>K. pneumoniae</i> produtor de ESBL.....	41

TABELAS

Tabela 1: Distribuição por género dos 26 pacientes com infeção por <i>K. pneumoniae</i> incluídos.	36
Tabela 2: Resultado dos testes de suscetibilidade dos isolados Kp6, Kp7, Kp14 e Kp27.	38
Tabela 3: Resumo dos dados analisados dos isolados Kp4, Kp5, Kp6, Kp7 e Kp27.....	44

ANEXOS

Anexo 1: Sequências dos <i>primers</i> usados na detecção de β -lactamases.....	65
Anexo 2: Sequências dos <i>primers</i> usados na detecção de genes de resistência à colistina.....	66
Anexo 3: Sequências dos <i>primers</i> usados em MLST de <i>K. pneumoniae</i> (Diancourt et al, 2005)...	67
Anexo 4: Sequências dos <i>primers</i> usados na detecção de plasmídeos do grupo Inc (Carattoli et al., 2005).....	68

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
1.2. Agentes Antimicrobianos.....	2
1.2.1. Mecanismo de ação dos antibióticos	3
1.2.2. Resistência a antibióticos	4
1.2.3. Mecanismos bacterianos de resistência aos antibióticos	6
1.2.3.1. Diminuição da concentração intracelular: impermeabilidade da membrana externa e bombas de efluxo	7
1.2.3.2. Alteração do local de ação dos antibióticos.....	8
1.2.3.3. Inativação ou alteração enzimática	8
1.2.4. Mecanismos bacterianos de transferência horizontal de genes	9
1.3. Resistência aos antibióticos β -lactâmicos	10
1.3.1. Classificação de β -lactamases	10
1.4. β -lactamases de espectro alargado (ESBLs)	11
1.4.1. Detecção de ESBLs	12
1.5. Carbapenemases.....	12
1.5.1. Detecção de carbapenemases	14
1.6. Colistina (ou Polimixina E).....	15
1.6.1. Resistência à colistina	16
1.7. Métodos de tipagem molecular em patógenos bacterianos	17
1.7.1. Tipagem por sequenciação de múltiplos <i>loci</i> (MLST).....	18
1.8. Tipagem de plasmídeos	19
1.9. Resistência aos antibióticos em Portugal	21
1.10. Objetivos e hipóteses	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Isolados clínicos.....	25
2.2. Conservação dos isolados	25

2.3.	Teste de suscetibilidade antimicrobiana e detecção fenotípica de β -lactamases	25
2.4.	Detecção molecular e identificação de β -Lactamases.....	26
2.5.	Teste de suscetibilidade antimicrobiana e detecção fenotípica de resistência à colistina.....	28
2.6.	Detecção de genes associados à resistência à colistina	28
2.6.1.	Desenho dos primers para <i>mcr-3</i> e <i>mcr-5</i>	30
2.7.	Testes de conjugação	31
2.8.	Tipagem molecular de isolados bacterianos e plasmídeos.....	33
2.8.1.	MLST	33
2.8.2.	Tipagem de plasmídeos do grupo Inc.....	34
3.	RESULTADOS.....	35
3.1.	Caracterização dos isolados bacterianos	35
3.2.	Crescimento bacteriano	37
3.3.	Identificação bacteriana	37
3.4.	Suscetibilidade aos antibióticos.....	37
3.5.	Organização dos isolados	39
3.6.	Resultados do Grupo 1	40
3.6.1.	Detecção e identificação de β -lactamases nos isolados	40
3.6.2.	Teste de conjugação	42
3.6.3.	Detecção molecular e identificação de β -lactamases nos transconjugantes.....	43
3.6.4.	Tipagem de plasmídeos do grupo Inc.....	43
3.6.5.	Tipagem molecular de isolados bacterianos	43
3.7.	Resultados do Grupo 2	45
3.7.1.	Detecção de genes de resistência à colistina	45
4.	DISCUSSÃO.....	46
5.	CONCLUSÃO GERAL	55
6.	REFERÊNCIAS	57
7.	ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, que pertence à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria de Gram-negativo e foi descrita pela primeira vez por Carl Friedlander em 1882 como uma bactéria isolada dos pulmões de pacientes que morreram com pneumonia [1]. *K. pneumoniae* é de natureza ubíqua [2] (presente em plantas, animais e seres humanos) [1] e é um importante agente patogénico oportunista para infeções adquiridas tanto no hospital como na comunidade [3], [4], causando infeções do trato respiratório, do trato urinário (UTIs) e septicémias [1].

Atualmente, existe uma grande ameaça para a saúde pública devido ao isolamento emergente de estirpes de *K. pneumoniae* resistentes a múltiplos antibióticos (MDR) [5], o que leva à limitação das opções de tratamento e dificulta o controlo de infeções. Define-se bactéria multirresistente como bactérias que contêm três ou mais mecanismos de resistência antimicrobiana que afetam pelo menos três classes de antibióticos [6]. Os desafios terapêuticos associados as essas estirpes altamente resistentes correlacionam-se com maior morbidade e mortalidade, aumento do tempo de hospitalização e aumento geral dos custos de cuidados de saúde [7].

A resistência em *K. pneumoniae* adquire-se-se por mutação ou por aquisição de elementos genéticos móveis. *K. pneumoniae* carrega um gene de resistência β -lactamase que torna as penicilinas de espectro alargado ineficaz [8].

A elevada frequência de resistência às cefalosporinas nesta espécie mediada frequentemente pela síntese de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) leva a que o tratamento para as infeções por *K. pneumoniae* confirmadas ou suspeitas, em muitas situações tenha de depender de carbapenemos, se disponíveis. Assim, *K. pneumoniae* é hoje a principal causa de infeções causadas por bactérias resistentes aos carbapenemos

em todo o mundo. As enzimas mais importantes que podem conferir resistência aos carbapenemos (e geralmente aos restantes antibióticos beta-lactâmicos), as carbapenemases, foram detetados em estirpes de *K. pneumoniae*, tornando quase ineficazes todas as opções de tratamento disponíveis [8].

Uma preocupação ainda maior é o aparecimento de infeções com estirpes resistentes aos carbapenemos que precisam de ser tratadas com antibióticos de último recurso, quando existem. Estes antibióticos, como a colistina, não estão amplamente disponíveis e os tratamentos nos pacientes infetados por essas estirpes não é totalmente eficaz [8].

1.2. Agentes Antimicrobianos

A descoberta de antibióticos revolucionou a história da medicina como sendo uma das formas mais bem-sucedidas de quimioterapia em vários aspectos e, desde então, contribuiu para reduzir o número de mortes por doenças infecciosas em todo o mundo, representando um ponto de mudança na história da humanidade [9]. Desde a introdução de sulfonamida e penicilina em uso clínico nas décadas de 1930 e 1940, respetivamente, grande número de antibióticos foram descobertos e desenvolvidos. Na verdade, esses primeiros antibióticos eram escassos e caros, sendo inicialmente reservados para serem usados pelos militares durante a Segunda Guerra Mundial [10].

Os antibióticos podem ser definidos como compostos naturais produzidos por microorganismos ou por síntese química, que inibem o crescimento bacteriano (efeito bacteriostático) ou que têm efeito microbicida (bactericida) [11].

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com o local de ação ou estrutura química. A combinação destes dois parâmetros será adotada para melhor compreender o seu mecanismo de ação que resulta da interação entre o antibiótico e a bactéria e o mecanismo de resistência bacteriana que resulta da interação entre a bactéria e o antibiótico [11].

1.2.1. Mecanismo de ação dos antibióticos

A interação entre o antibiótico e a bactéria traduz-se por toxicidade seletiva, ou seja, idealmente o antibiótico deve ter um alvo ou um local de ação que deve ser específico da bactéria e que não deve existir na célula eucariótica. Os principais mecanismos de ação dos antibióticos são: (1) Inibição da síntese da parede celular (p. ex. β -lactâmicos); (2) Inibição da síntese proteica (p. ex. Aminoglicósidos; Tetraciclinas); (3) Inibição da síntese dos ácidos nucleicos (p. ex. Sulfonamidas; Quinolonas); (4) Modificação da membrana celular (p. ex. Polimixinas; Daptomicina) [11], [12].

Dos mecanismos de ação anteriormente apresentados, é de realçar a inibição da síntese da parede celular e modificação da membrana celular, por serem os mecanismos de ação dos antibióticos usados neste estudo.

Ao contrário das células procarióticas, as células eucarióticas humanas não possuem peptidoglicano ou parede celular. Isso faz com que a parede da célula bacteriana seja um alvo ideal para a terapia com antibióticos, porque a terapia não terá como alvo a célula humana, e espera-se menor toxicidade [12]. Como exemplo destes antibióticos temos os β -lactâmicos.

A integridade da membrana citoplasmática, e da membrana externa em bactérias de Gram-negativo, é vital para a bactéria. Os antibióticos que interagem com a membrana celular provocam a morte celular. Contudo, dada a semelhança dos fosfolípidos das bactérias e das células eucarióticas, não é uma ação suficientemente específica que permita uma ampla aplicação destes antibióticos na terapêutica [11]. Exemplo desses antibióticos é a colistina.

1.2.2. Resistência a antibióticos

A chamada “era dos antibióticos”, a partir dos anos cinquenta, levou ao otimismo de que as doenças infecciosas podem ser tratadas, controladas e prevenidas e a confiança de que a medicina moderna prevaleceria contra doenças infecciosas [13]. No entanto, em contraste com esse otimismo, as doenças infecciosas ainda são a segunda principal causa de morte em todo o mundo [14].

No mundo inteiro, a resistência aos antibióticos aumentou dramaticamente e é reconhecida como um grande desafio atual em saúde pública [15]–[17]. Na União Europeia, a cada ano, cerca de 25 mil pacientes morrem devido a infecção por uma bactéria multirresistente [15]–[17], com um custo para os serviços públicos de saúde de 1,5 bilhão de euros [17]. De acordo com o *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC), Portugal é o país com a maior taxa de infecções hospitalares e as maiores taxas de resistência registadas na Europa [17].

A resistência aos antibióticos foi reconhecida logo após a introdução na clínica de sulfonamidas e penicilina [10], e agora parece que o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos é inevitável.

Vários fatores desempenham um papel para a carga global de resistência bacteriana, no entanto, o elevado e inadequado consumo de antibióticos combinado com o nível de conformidade das medidas de controlo de infeção têm sido sugeridos como a força motora para a emergência da resistência global a antibióticos [18], [19]. Estima-se que o intestino humano contenha 10^{13} - 10^{14} bactérias, 10 vezes mais do que as células humanas totais no corpo [20], e assim, o microbiota intestinal humano fica indiscriminadamente exposto à pressão de seleção sempre que os antibióticos são usados. Portanto, a resistência mais significativa vem emergindo de agentes patogénicos oportunistas [18].

Uma vez a resistência selecionada, a transmissão rápida de humanos para humanos de patógenos com genes de resistência permite a sua propagação. Embora a consciência esteja aumentando, as medidas básicas de controlo de infeção, como a higiene das

mãos, são subóptimas em muitas configurações. Por outro lado, o isolamento do paciente e o início do tratamento eficaz são muitas vezes atrasados ou omitidos por atrasos no diagnóstico ou devido ao alto custo subjacente [19]. No contexto europeu, Portugal continua a ser um país com elevado uso de antibióticos, embora o uso destes fármacos tenha diminuído nos últimos anos [17].

Entre outros fatores, a globalização deslocou o equilíbrio para a emergência e a disseminação descontrolada de resistência. Viagens internacionais, adoção, comércio e migração facilitam a globalização da resistência antimicrobiana. O fácil acesso ao transporte aéreo e terrestre permite que as pessoas viajem para diferentes países e continentes em questão de horas ou dias. Esta crescente mobilidade populacional de viajantes e trabalhadores migrantes entre países desempenha um papel importante na globalização das ameaças e riscos para a saúde pública [21].

Além do consumo cada vez maior de antibióticos para tratar a doença, o uso excessivo e inadequado de antibióticos em medicina animal e na indústria de produção animal, bem como a libertação descontrolada de compostos antibacterianos no ambiente [17], tem sido reconhecido como uma das causas do problema e constitui um fator importante na pressão seletiva que leva ao aparecimento e disseminação de bactérias e/ou genes resistentes a antibióticos [22]. No entanto, é conhecido que a maioria dos antibióticos são naturalmente produzidos por microrganismos e, portanto, é verdade que os microrganismos podem desenvolver um sistema de compensação para sua sobrevivência. Isso apoia a hipótese de que a resistência aos antibióticos também é um fenómeno antigo e de ocorrência natural. O solo é geralmente um dos maiores e mais diversos habitats microbianos na Terra e é reconhecido como um vasto repositório de genes de resistência a antibióticos, o resistoma [16], [23], [24].

Assim, estratégias combinadas são necessárias para prevenir o surgimento e disseminação de estirpes resistentes aos antibióticos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a manutenção de sistemas de vigilância, o uso racional de antibióticos e medidas de controlo de infeção, bem como esforços para desenvolver novos agentes antibacterianos [24].

1.2.3. Mecanismos bacterianos de resistência aos antibióticos

A resistência aos antibióticos é considerada um fenômeno ecológico que ocorre como uma resposta das bactérias ao uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. As bactérias multiplicam-se rapidamente, mutam, e podem transferir material genético entre estirpes ou espécies diferentes. São consideradas microorganismos com alta plasticidade genética capazes de se adaptar a vários fatores, incluindo a exposição a agentes químicos poderosos [17].

A resistência bacteriana aos antibióticos ocorre através de mecanismos intrínsecos ou adquiridos. O mecanismo intrínseco é uma característica de espécies bacterianas particulares e é especificado por genes que ocorrem naturalmente no cromossoma. Esta resistência passiva é uma consequência de processos adaptativos gerais que não são necessariamente ligados a uma determinada classe de antimicrobianos [25].

A resistência adquirida é o mecanismo principal ativo da resistência antimicrobiana e é o resultado de uma pressão evolutiva específica para desenvolver um mecanismo de contra-ataque contra um agente antimicrobiano ou uma classe de antimicrobianos, de modo que as populações bacterianas anteriormente suscetíveis a um antimicrobiano tornam-se resistentes [26]. Esta nova propriedade é o resultado de alterações das células bacterianas causadas por alterações genéticas cromossômicas e extra-cromossômicas (plasmídeos), e também é uma resistência hereditária que é estável, irreversível e independente do meio ambiente [17]. A resistência adquirida pode ser passada verticalmente para as células filhas ou pela transferência horizontal de genes (HGT) de resistência entre estirpes e espécies através dos processos de transformação, conjugação e transdução [25].

Em geral, as bactérias resistem à ação inibitória dos antibióticos através de três mecanismos primários, que podem operar em sinergismo [27]. Os principais mecanismos de resistência antimicrobiana ativa são: (I) prevenção da acumulação intracelular de antimicrobianos, quer pela diminuição da permeabilidade da membrana externa, quer pelo aumento do efluxo de antimicrobianos da célula através de proteínas de bombeamento

associadas à membrana; (II) modificação do local do alvo por mutação, o que reduz a afinidade para o antimicrobiano; e (III) inativação de antibióticos por hidrólise ou por modificação da estrutura [17], [28].

1.2.3.1. Diminuição da concentração intracelular: impermeabilidade da membrana externa e bombas de efluxo

A membrana externa (ME), típica e exclusiva em bactérias de Gram-negativo, é responsável por dar forma e rigidez à célula bacteriana. A entrada de compostos direcionados para o citoplasma geralmente é conseguida através de mecanismos de transporte mediados por transportador ou por canais na membrana externa denominados porinas [17]. Os compostos antibacterianos transportados deste modo podem estar sujeitos a resistência por perda de transportadores não essenciais, por falta de porinas ou por mutações capazes de modificar a estrutura das proteínas das porinas e, assim, diminuir o influxo [25], [28], [29].

Quando pequenas moléculas, ou um antibiótico, são expulsos de uma célula bacteriana, isto é chamado de efluxo. As bombas de efluxo são constituídas por proteínas transportadoras de membrana usadas por células bacterianas para bombear compostos tóxicos, incluindo diversos antibióticos [17], [25]. As bombas de efluxo podem ser específicas para um antibiótico [17] e são aceitas como um dos principais mecanismos de resistência a múltiplos antibióticos (MDR) entre bactérias, particularmente entre bactérias de Gram-negativo [27].

O efluxo ativo é relevante para antibióticos que atuam dentro da célula bacteriana e ocorrem quando o microorganismo é capaz de desenvolver um mecanismo de transporte ativo que bombeia as moléculas de antibióticos que penetram na célula para o exterior [10]. Na mesma velocidade em que os antimicrobianos entram na célula, os mecanismos de efluxo são bombeados, antes que eles atinjam o seu alvo [25]. Isso significa que o mecanismo de transporte de efluxo deve ser mais eficiente do que o mecanismo de influxo para ser efetivo [10].

1.2.3.2. Alteração do local de ação dos antibióticos

Uma estratégia comum para que as bactérias desenvolvam resistência antimicrobiana é evitar a ação do antibiótico interferindo no seu local alvo [30], e assim, evitar os efeitos nocivos dos antibióticos [27]. Para conseguir isso, as bactérias desenvolveram táticas diferentes, incluindo a proteção do alvo (evitando que o antibiótico alcance seu local de ligação) e modificações estruturais do alvo que resultam na diminuição da afinidade do antibiótico [30]. As modificações dos locais alvo dos antimicrobianos resultam de variações naturais ou de alterações adquiridas [25]. As variações naturais resultam da mutação espontânea de um gene bacteriano no cromossoma e seleção na presença do antimicrobiano [25]. Mas o mecanismo mais comum de alteração do alvo é a aquisição de novos genes, que resultam na modificação enzimática do alvo normal, de modo que ele não se liga ao antibiótico [28].

1.2.3.3. Inativação ou alteração enzimática

Algumas bactérias produzem enzimas que seletivamente inativam o antibiótico [17], [25]. A inativação enzimática seja por hidrólise ou por alteração estrutural é o principal mecanismo de resistência em bactérias patogênicas a antibióticos como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e cloranfenicol [28]. São, respectivamente, beta-lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e cloranfenicol acetiltransferases [29].

As beta-lactamases são enzimas com capacidade para hidrolisar o anel beta-lactâmico do antibiótico e representam o mecanismo de resistência mais comum para esta classe de agentes antibacterianos em bactérias de Gram-negativo clinicamente importantes [25]. A resistência aos beta-lactâmicos provém da mutação natural de genes cromossômicos ou da aquisição de elementos genéticos extra-cromossômicos, como plasmídeos ou transposões, enquanto a resistência aos aminoglicosídeos baseia-se principalmente em uma modificação química do aminoglicosídeo que compromete a ligação do alvo a subunidade ribossômica [31]. O grupo de transferases são enzimas que modificam covalentemente antibióticos levando a alterações estruturais que prejudicam a ligação alvo [25].

1.2.4. Mecanismos bacterianos de transferência horizontal de genes

A aquisição de resistência a vários antibióticos está associada principalmente à transferência horizontal, que se define pelo movimento da informação genética entre os microrganismos [32], um processo que inclui a propagação de genes de resistência a antibióticos entre bactérias através de elementos genéticos móveis.

Os elementos genéticos móveis (MGE) são definidos como segmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que se movem nas moléculas de ADN dentro da célula (mobilidade intracelular) ou entre genomas de células bacterianas, também conhecida como mobilidade intercelular [33]. A transferência horizontal de genes ocorre por três mecanismos genéticos: a transformação, a conjugação e a transdução [32].

A transformação natural foi o primeiro mecanismo de transferência horizontal de genes (HGT) procariótico a ser descoberto [33]. Consiste num processo onde após lise de uma célula e libertação do seu material genético para o exterior, outras bactérias podem capturar esse ADN e incorporá-lo no seu genoma, desde que sejam naturalmente competentes. Esse ADN pode ser originário de cromossomas, plasmídeos ou bacteriófagos [17].

A conjugação bacteriana é um dos principais mecanismos de HGT responsável pela disseminação da resistência aos antibióticos [10]. Exige replicação independente de plasmídeos conjugativos [33]. Esses elementos genéticos codificam proteínas que facilitam sua própria transferência da célula dadora portadora de plasmídeo para a célula recetora [33] e um contato físico estável deve ser estabelecido entre a célula dadora e o recetor para permitir a transferência de ADN [34]. Os plasmídeos transferidos por conjugação podem conter genes de resistência para muitos antimicrobianos conferindo multirresistência às bactérias recetoras [17].

Por fim, a transferência de genes por transdução é mediada por bacteriófagos [33]. O processo de transdução envolve a infeção da célula bacteriana [10]. Após a lise celular, o bacteriófago atua como um vetor, e quando ele infeta uma nova célula, pode inserir

segmentos de ADN bacteriano que contêm o gene de resistência e torná-la resistente [17].

1.3. Resistência aos antibióticos β -lactâmicos

A resistência aos β -lactâmicos pode ser proporcionada por alteração da conformação das proteínas de ligação à penicilina (PBP), diminuição da permeabilidade da membrana externa (ME), efluxo ativo ou por inativação de antibióticos por presença de β -lactamases [35]. No entanto, a produção de β -lactamases representa o mecanismo mais frequentemente reportado de resistência aos antibióticos β -lactâmicos entre as bactérias de Gram-negativo [4].

1.3.1. Classificação de β -lactamases

As β -lactamases são a principal causa de resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos [36]. Estas enzimas são responsáveis por inativarem os β -lactâmicos por hidrólise do anel β -lactâmico [37], o mecanismo de resistência mais comum em bactérias de Gram-negativo clinicamente importantes [38].

Existem dois esquemas de classificação globalmente aceites para as β -lactamases, onde o primeiro é baseado na classificação de sequências de aminoácidos (molecular), classificação de Ambler [39] e o segundo é baseado no perfil de hidrólise das enzimas, tendo em conta vários critérios como o perfil de inibição enzimática, classificação de Bush e Jacobs [38].

As β -lactamases foram divididas em quatro classes (Classe A-D) com base na sua similaridade de sequência de aminoácidos por Ambler em 1980, e é hoje em dia a classificação mais utilizada. As enzimas das classes A, C e D têm no local ativo, um resíduo de serina, enquanto as β -lactamases da classe B, também conhecidas como metalo- β -lactamases (MBL) ou carbapenemases, possuem um ião zinco que participa na catálise [40] e incluem enzimas como IMP e VIM [37]. A classe A é usualmente definida como contendo penicilinasas [37], mas também inclui outras enzimas como β -lactamases

de espectro alargado (ESBL) e o tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) [41]; a classe C refere-se às cefalosporinas (AmpC) e a classe D refere-se às oxacilinas tais como, a OXA-48 [37], um grupo de beta-lactamases bastante heterogêneo.

O esquema de classificação por funcionalidade resultou em três grupos principais: Grupo 1 de Cefalosporinas (Classe C), Grupo 2 de β -lactamases de serina (Classe A e Classe D) e Grupo 3 de metalo- β -lactamases (Classe B) [40].

Até à data, mais de 1600 β -lactamases diferentes foram reconhecidas [42]. Entre as consideradas como clinicamente importantes, e amplamente disseminadas, encontram-se as β -lactamases de espectro alargado das famílias CTX-M, TEM e SHV [43].

1.4. β -lactamases de espectro alargado (ESBLs)

As ESBLs são um grupo de β -lactamases que evoluiu rapidamente, que hidrolisam eficazmente penicilinas, oximino-cefalosporinas e monobactâmicos, mas são inibidas por inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico. As ESBLs são frequentemente β -lactamases mediadas por plasmídeos, o que contribui para a sua disseminação [44], [45].

Uma variedade de MGEs, tais como transposões e sequências de inserção, desempenham um papel importante na disseminação de genes que codificam ESBLs [46]. As ESBLs do tipo TEM evoluíram a partir de mutação dos genes *bla*_{TEM-1} e *bla*_{TEM-2} mediados por plasmídeo, que codificam penicilinas, sendo *Escherichia coli* o principal produtor de ESBL de tipo TEM [46], enquanto as ESBLs do tipo SHV, derivados do gene cromossômico *bla*_{SHV-1/2} ocorrem principalmente em *K. pneumoniae* [47] e são adquiridas por sequências de inserção do cromossoma para o plasmídeo [46]. Em contraste com as ESBLs do tipo TEM e SHV, os genes *bla*_{CTX-M} têm origem em genes cromossômicos de β -lactamase de *Kluyvera spp.*, que são bactérias ambientais encontradas em todo o mundo, e são adquiridas principalmente por elementos da sequência de inserção [48]. TEM, SHV e CTX-M são os tipos de ESBLs mais detetados em todo o mundo [49].

1.4.1. Detecção de ESBLs

Muitos testes foram recomendados para a detecção de produção de ESBLs *in vitro* [50]. O teste de sinergia de disco duplo (DDST) é recomendado como o teste fenotípico confirmatório para detecção de ESBLs entre *Enterobacteriaceae* em que o disco contendo ácido clavulânico é colocado no centro da placa com agar Mueller-Hinton entre duas cefalosporinas de terceira geração [51], geralmente cefotaxima e ceftazidima. O teste molecular confirmatório é realizado pelo PCR.

1.5. Carbapenemases

Os carbapenemos são uma das classes de antibióticos que constituem uma das escolhas para o tratamento de infecções por bactérias de Gram-negativo multirresistentes devido à produção de ESBLs [52]. O seu crescente uso tem como consequência o aparecimento cada vez mais frequente de estirpes de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos [52], que emergiram como uma das principais causas de infecções nosocomiais, tornando-se uma enorme preocupação em todo o mundo [53]. Portanto, a detecção e vigilância de microrganismos resistentes ao carbapenemos tornaram-se uma questão de grande importância para a seleção do esquema terapêutico apropriado e implementação da melhoria de medidas de controlo de infeção.

As carbapenemases mais frequentes são categorizadas em três classes de enzimas: (I) o tipo KPC, (II) Metallo- β -lactamases VIM, IMP e NDM e (III) as enzimas do tipo OXA-48 [54]. As enzimas do tipo KPC hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenemos [55], as MBL hidrolisam carbapenemos e vários β -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos [56] e as enzimas do tipo OXA-48 hidrolisam penicilinas e imipenemo, mas não as cefalosporinas de espectro alargado [57]. No entanto, a produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) está sendo reportada como o mecanismo mais comum para a resistência aos carbapenemos em isolados de *Enterobacteriaceae* [58].

A disseminação rápida e crescente de *Enterobacteriaceae* que produzem KPC representa atualmente uma preocupação a nível mundial, uma vez que o gene *bla*_{KPC} se localiza frequentemente em plasmídeos com potencial para se disseminarem entre outras espécies bacterianas. O gene *bla*_{KPC} está tipicamente localizado dentro de um transposão móvel de 10kb (Tn4401) [59], um elemento genético que é capaz de se inserir em diversos plasmídeos de bactérias de Gram-negativo [60]. Os plasmídeos que transportam *bla*_{KPC} também transportam frequentemente determinantes de resistência para outros antibióticos [60].

Com base na sua sequência de nucleótidos, diferentes variantes de KPC foram descritas, sendo KPC-2 e KPC-3 as mais frequentemente encontradas [41]. Estudos sobre epidemiologia molecular de bactérias produtoras de KPC revelaram que poucas linhagens foram responsáveis pela disseminação de genes que codificam KPC sendo o tipo de sequência 258 (ST258), o genótipo mais dominante [56], e considerado um “clone internacional de alto risco” [41].

A resistência mediada por MBL está a emergir em todo o mundo e deve-se principalmente à mobilização de MBL do tipo IMP, VIM e NDM em patógenos de Gram-negativo, incluindo *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* [61]. A maioria das MBLs transferíveis são comumente codificadas por genes inseridos em integrões, que são segmentos móveis de ADN com capacidade de capturar cassetes de genes por recombinação específica no local de ligação, sendo os integrões da classe I os mais reportados e bem caracterizados em estirpes de origem clínica [62].

A β -lactamase NDM-1 é uma MBL identificada pela primeira vez em 2009 em Nova Deli, Índia, de um paciente que adquiriu infeção do trato urinário (UTI) devido a *K. pneumoniae* resistente a carbapenemos, e resistente a todos os antibióticos testados, com exceção da colistina. Desde então tem sido descrito um número crescente de infeções em pacientes da Índia, Paquistão e Reino Unido [63]. O gene *bla*_{NDM-1} foi encontrado em diferentes plasmídeos de grande tamanho (um plasmídeo de 180 kb para *K. pneumoniae* e um de 140 kb para *E. coli*), que são facilmente transferíveis com elevada frequência para a estirpe de laboratório suscetível aos antibióticos *E. coli* J53 [64]. A carbapenemase NDM-

1 foi encontrada em diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Morganella morganii* [63].

A carbapenemase OXA-48 foi descrita pela primeira vez em isolados epidémicos de *K. pneumoniae* da Turquia, cujo gene se localizava num plasmídeo, e depois reportada em muitos outros países [65]. Além da *K. pneumoniae*, OXA-48 foi identificado em *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii* e *Providencia rettgeri* [66].

1.5.1. Detecção de carbapenemases

A deteção de produtores de carbapenemase em clínica baseia-se primeiro nos resultados de testes de suscetibilidade obtidos por difusão em disco ou por sistemas automatizados [67]. No entanto, a resistência de baixo nível, e até a suscetibilidade a carbapenemos, foram observadas para produtores de qualquer tipo de carbapenemases [68]. Assim, foram desenvolvidos testes específicos para a deteção de carbapenemases a partir de rastreio fenotípico para técnicas moleculares avançadas.

O método da folha de trevo ou teste Hodge modificado (MHT) tem sido amplamente utilizado como um método fenotípico geral para a deteção da atividade da carbapenemase. Baseia-se na inativação de um carbapenemo por estirpes produtoras de carbapenemase que permitem que uma estirpe indicadora suscetível ao carbapenemo aumente o crescimento em direção a um disco contendo carbapenemo, ao longo da linha de inóculo da estirpe testada [69]. O ensaio é, em geral, sensível para a deteção de um mecanismo de resistência mediado por carbapenemase [67] e isolados múltiplos podem ser testados em uma única placa de agar Mueller-Hinton [70]. No entanto, o teste é demorado e pode faltar especificidade [13]. MHT foi considerado útil para a deteção de produtores de KPC e OXA [56].

Vários testes baseados em inibidores foram desenvolvidos para deteção específica de produtores de MBL. Eles são baseados na sinergia entre os inibidores de MBL, como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido dipicolínico e um carbapenemo

(imipenemo e/ou meropenemo) e/ou uma oximino-cefalosporina (ceftazidima) como compostos indicadores β -lactâmicos [67]. Esses testes aproveitam a dependência de metaloenzimas nos íons de zinco e usam os agentes quelantes para inibir a hidrólise de β -lactâmicos. Vários formatos, como a difusão em disco ou a diluição de caldo de testes de sinergia baseados em EDTA, foram mais utilizados e avaliados [67].

A medida espectrofotométrica da hidrólise de carbapenemos é considerada o método padrão de referência para a detecção da produção de carbapenemase em um organismo suspeito [67]. No entanto, este ensaio é demorado, requer treino e equipamento específicos e não discrimina facilmente entre diferentes tipos de carbapenemases [68].

As técnicas de biologia molecular, geralmente as metodologias baseadas em PCR e sequenciação, são um método para a identificação de carbapenemases. As desvantagens das tecnologias moleculares incluem o seu custo, a exigência de pessoal treinado e a ausência de detecção de novos genes.

1.6. Colistina (ou Polimixina E)

As polimixinas foram utilizadas, a partir dos anos cinquenta, no tratamento de infecções causadas por bactérias de Gram-negativo, sendo removidas mais tarde pelos efeitos nefrotóxico e neurotóxico que acarretava. No entanto, devido à crescente prevalência de bactérias de Gram-negativo resistentes aos carbapenemos (e muitos outros antibióticos), foi recentemente admitida a reintrodução da colistina como uma opção terapêutica [71]. As polimixinas (polimixina B e colistina) estão entre os poucos agentes antimicrobianos que retêm a atividade, sendo componentes-chave nos tratamentos antimicrobianos contra *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC-KP) [72].

A colistina (ou polimixina E) é um antibiótico efetivo contra a maioria das bactérias de Gram-negativo resistentes a múltiplos antibióticos (MDR) [73], cujo alvo é a membrana externa (ME) destas [71], e atualmente é usado como um antibiótico de última linha para o tratamento de infecções bacterianas [74]. Infelizmente, o uso aumentado e inadequado de colistina levou inexoravelmente ao surgimento mundial de bactérias resistentes à colistina

[74]. Pouco tempo após a reintrodução da colistina na prática clínica, o surgimento de estirpes resistentes a colistina (Col-R), particularmente em isolados KPC-KP, foi reportado [75].

1.6.1. Resistência à colistina

A resistência à colistina é normalmente devida a uma redução da atração eletrostática entre o peptídeo policationico colistina e a ME das bactérias de Gram-negativo [76], por modificação do lipopolisacarídeo (LPS) bacteriano [73]. Esta resistência pode ser devida à inativação de genes cromossomais (como *mgrB*, *phoP*, *phoQ*) [77] ou presença de genes *mcr* transportados em plasmídeos (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr4* e *mcr-5*) [78]–[82].

O mecanismo mais comum para o desenvolvimento da resistência às polimixinas ocorre através da modificação do lipopolisacarídeo (LPS) bacteriano [73]. A maioria dos mecanismos envolvem modificações do lípido A do LPS, pela adição de grupos carregados positivamente, tais como 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-ara4N) e/ou fosfoetanolamina (PetN) [83], o que diminui a afinidade de polimixinas ao alvo LPS [77].

As mutações nos sistemas reguladores da transcrição (PhoP-PhoQ e PmrA-PmrB) que controlam essas alterações no LPS são um mecanismo genético comum que leva à resistência à colistina [75]. A MgrB é uma pequena proteína transmembranar reguladora cuja produção é induzida após a ativação do sistema de sinalização PhoP-PhoQ e que exerce um *feedback* negativo no mesmo sistema [77]. A inativação através de numerosas mutações (*nonsense*, *missence*, eliminação, inativação insercional) do gene *mgrB* parece ser o mecanismo de resistência à colistina mais frequente encontrado em *K. pneumoniae* [74]. Recentemente, a transposição de genes que codificam ESBLs ou carbapenemases, levando à ruptura de gene cromossômico *mgrB*, foi relatada como fonte de resistência à colistina [71].

Até 2015, a resistência à colistina sempre foi associada a um mecanismo cromossômico com reduzida possibilidade de transferência horizontal [75]. Mas recentemente, genes mediados por plasmídeos foram detectados. O primeiro gene, *mcr-1*, foi detectado por Liu

et al., em 2015 em isolados *Escherichia coli* em porcos [78] seguido dos genes *mcr-2* por Xavier et al., em 2016 [79], e em 2017, *mcr-3* por Yin et al., [80], *mcr-4* por Carattoli et al. [81] e *mcr-5* por Borowiak et al. [82].

1.7. Métodos de tipagem molecular em patógenos bacterianos

Compreender a infecção bacteriana e o desenvolvimento de medidas para combater a sua propagação, depende da capacidade de caracterizar as variantes de patógenos bacterianos [84]. Identificar diferentes tipos de microrganismos dentro de uma espécie é chamado de tipagem [85], sendo que o papel principal da tipagem microbiana é avaliar a relação genética entre os isolados microbianos [86]. A compreensão da relação clonal entre as estirpes microbianas é essencial para determinar a origem e as rotas das infecções, confirmar ou excluir surtos, traçar a transmissão cruzada de patógenos associados à saúde, reconhecer estirpes particularmente virulentas e avaliar a eficácia das medidas de controlo. A tipagem bacteriana também contribuiu bastante para aumentar a eficácia dos sistemas de vigilância e fornecer pistas importantes para as estratégias de controlo da saúde pública [86].

Teoricamente existem dois sistemas de tipagem distintos: fenotipagem e genotipagem [87]. Os sistemas tradicionais de tipagem baseados em fenótipos, como serotipo, biótipo, fago ou antibiograma, foram utilizados por muitos anos [85]. Contudo, esses métodos geralmente são muito variáveis, laboriosos e demorados para possuir valor prático nas investigações epidemiológicas [86]. No entanto, na era genómica os métodos que examinam a relação dos isolados a um nível molecular revolucionaram a nossa capacidade de diferenciar os tipos de bactérias (ou subtipos). A genotipagem, que se refere à discriminação de estirpes bacterianas com base em seu conteúdo genético, tornou-se amplamente utilizada para a tipagem de estirpes bacterianas devido à sua alta resolução. O perfil genético de uma dada estirpe gerada por um método de genotipagem específico pode ser tão exclusivo como uma impressão digital [87].

Os métodos atuais de tipagem de estirpes bacterianas podem ser classificados em três categorias principais: (1) padrões de bandas de ADN, (2) sequenciação de ADN e (3)

métodos baseados em hibridação de ADN [86], [88]. Os métodos de genotipagem baseados em padrões de bandas de ADN discriminam as estirpes estudadas com base nas diferenças no tamanho das bandas de ADN (fragmentos) geradas pela amplificação do ADN genómico ou por clivagem de ADN usando enzimas de restrição (REs). Os métodos de genotipagem baseados na sequenciação de ADN geram a sequência original de nucleotídeos e discriminam entre linhagens bacterianas diretamente de polimorfismos no ADN. Os métodos baseados em hibridação de ADN são principalmente referidos como *macroarray* de ADN e estudos de *microarray*. Nesta técnica, as estirpes bacterianas são discriminadas através da análise da hibridação do seu ADN com sondas de sequências conhecidas [87].

Aqui, os princípios e aplicações do sistema de Tipagem de sequência *Multi-Locus* (MLST) são descritos em detalhe, devido ao facto de ter sido o sistema usado neste trabalho. O MLST é um método de tipagem usado em quase todas as espécies bacterianas clinicamente importantes para estudar a sua relação clonal.

1.7.1. Tipagem por sequenciação de múltiplos *loci* (MLST)

Os genomas microbianos estão sujeitos a variações da sequência nucleotídicas devido a mutação ou recombinação. A variabilidade da sequência dentro de genes particulares pode ser usada em esquemas de tipagem molecular para determinar a relação genética entre bactérias. Um desses métodos é a sequenciação de múltiplos *loci* vulgarmente denominado MLST (*Multilocus sequence typing*), no qual as sequências de múltiplos genes conservados são comparadas por alteração de bases nucleotídicas [88].

Assim, o MLST é um método baseado na sequenciação de ADN de vários genes *housekeeping*, ou seja, genes necessários para funções celulares básicas, geralmente sete genes para *K. pneumoniae* [88]–[90]. Tipicamente, os fragmentos de 450-500 pares de bases (pb) são sequenciados [85], [89], [90], e a variação da sequência de genes é atribuída um número que corresponde a um alelo [87], sendo que a combinação dos sete números é usada para determinar o número que corresponde a um tipo de sequência

(ST) [85], [90], através de base de dados de MLST disponíveis online (www.mlst.net) [86]–[88]. Os isolados com o mesmo ST são definidos como clones pelo MLST [90].

Os dados produzidos por MLST são inequívocos [85], de alta reprodutibilidade e são facilmente compartilhados [88], comparáveis e acessíveis eletronicamente entre laboratórios (www.mlst.net) [89]. Por esta razão, o MLST é considerado um método de sucesso para estudos genéticos populacionais e para a epidemiologia global [86].

Embora possua as vantagens anteriormente mencionadas, o MLST também tem algumas desvantagens. A sequenciação de sete genes, ou mais, torna a sua execução dispendiosa, é um método laborioso e demorado [85]–[87].

1.8. Tipagem de plasmídeos

Os plasmídeos são definidos como moléculas de ADN de cadeia dupla linear ou circular, capazes de replicação autónoma [91], e transferíveis entre diferentes espécies bacterianas [92].

Os plasmídeos parecem aumentar a diversidade genética bacteriana, adquirir e perder genes [93] e podem promover a transferência horizontal entre populações bacterianas [94]. Eles contêm genes essenciais para a iniciação e controlo da replicação e genes acessórios que podem ser úteis para o hospedeiro, como a resistência antimicrobiana ou genes de virulência [93]. A aquisição de plasmídeos com resistência antimicrobiana ou genes de virulência pode alterar drasticamente a prevalência de clones bacterianos virulentos ou multirresistentes [81].

A identificação e a classificação dos plasmídeos são especialmente importantes na medicina porque os genes com características clinicamente importantes, como a resistência aos antibióticos e os fatores de virulência, são frequentemente transportados em plasmídeos e, portanto, o reconhecimento do tipo de plasmídeo de virulência ou resistência presente em um determinado patógeno pode ser crucial no rastreamento de fontes e propagação de infeções, e também pode servir para estabelecer o diagnóstico

laboratorial [95]. A capacidade de reconhecer e categorizar plasmídeos em grupos homogêneos com base na sua relação filogenética pode ser útil para analisar a sua distribuição na natureza, o relacionamento com a célula hospedeira e descobrir sua origem evolutiva [91].

Os plasmídeos estão presentes em quase todas as espécies bacterianas e variam de tamanho de alguns a muitos pares de quilo-bases (kb) [93]. No entanto, o número de cópia é uma característica fixa de qualquer plasmídeo em condições constantes e é controlado por um sistema codificado por plasmídeo que determina a taxa de início de replicação [96]. Em contraste, é impossível que os plasmídeos com o mesmo mecanismo de replicação coexistam na mesma célula bacteriana, um fenómeno chamado incompatibilidade (Inc) [91].

Um esquema formal de classificação de plasmídeos é baseado na incompatibilidade [93] e foi desenvolvido por Datta & Hedges em 1971 [91]. Este procedimento baseia-se na introdução por conjugação ou transformação de um plasmídeo de um grupo Inc desconhecido em uma célula que transporta um grupo de plasmídeo conhecido. Se o plasmídeo residente é eliminado no descendente, o plasmídeo recebido é atribuído ao mesmo grupo de incompatibilidade [93]. Os plasmídeos com o mesmo sistema de controlo de replicação são incompatíveis, enquanto os plasmídeos com diferentes controlos de replicação são compatíveis, portanto, nesta base, os plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo Inc não podem ser propagados na mesma linha celular [95]. Pelo menos 27 grupos Inc são reconhecidos entre *Enterobacteriaceae* [91].

Em 1988, Couturir e seus colaboradores propuseram um novo esquema de tipagem de plasmídeos com base na hibridização de Southern Blot usando regiões de replicação clonada como sondas para reconhecer os principais grupos de plasmídeos entre *Enterobacteriaceae* [95]. Esta abordagem forneceu com sucesso a classificação dos plasmídeos conjugativos e não conjugados, mas a baixa especificidade subestimou a diversidade plasmídica devido à reação de hibridação cruzada entre replicões altamente relacionados [94].

Carattoli et al., em 2005, criaram o primeiro esquema de tipagem de replicões baseados em PCR (PBRT). O protocolo PBRT foi realizado para identificar os grupos de plasmídeos Inc mais comuns ocorrendo entre *Enterobacteriaceae*, nomeadamente FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, L / M, N, P, W, T, A / C, K, B / O, X, Y, F e FIIA [93].

A PBRT é uma ferramenta de tipagem de plasmídeos mais barata e mais acessível, embora tenha várias limitações porque não cobre todos os grupos de Inc e também não consegue detetar novas replicões. O método mais preciso para caracterizar plasmídeos baseia-se no sequenciamento total de ADN [94].

1.9. Resistência aos antibióticos em Portugal

Em Portugal, como em vários outros países, há um aumento dramático da resistência aos antibióticos, especialmente para os β -lactâmicos. Vários estudos têm investigado a disseminação de ESBLs [97]–[100], OXA-48 [101], *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases [102]–[104] e genes de resistência à colistina [105]–[108].

Relativamente à investigação de disseminação de ESBLs, em 2007, Mendonça et al., identificaram estirpes de *E. coli* produtoras de CTX-M, particularmente CTX-M-15 em hospitais de três regiões de Portugal, possivelmente em consequência da disseminação de grandes clones entre hospitais e comunidades e entre regiões e da transferência horizontal de plasmídeos ou elementos genéticos móveis [97]. Em 2012, Correia et al., detetaram isolados de *E. coli* de amostras fecais recolhidos em pacientes em hemodiálise em Portugal que abrigavam os genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14a} e/ou *bla*_{CTX-M-1} associados a linhagens bacterianas bem-sucedidas, particularmente a *E. coli* ST131 virulenta e recentemente emergida [98]. Em 2014, Jones-Dias et al., analisaram *Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas de terceira geração recolhidos em unidades de cuidados de saúde distintas de diferentes regiões portuguesas, revelando uma diversidade de β -lactamases classe A de diferentes famílias, como TEM e CTX-M e detetaram também enzimas de classe C como as β -lactamases AmpC em *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp. [99]. Por fim, também em 2014, Calhau et al., analisaram isolados de *K. pneumoniae*

de pacientes transplantados renais em que identificaram duas principais linhagens genéticas, sendo uma delas, portadora do gene *bla*_{CTX-M-15} [100].

No entanto, o uso preferencial de carbapenemos para tratar infeções bacterianas produtoras de ESBL resistentes a múltiplos fármacos amplifica o risco de maior expansão de microrganismos produtores de carbapenemases, destacando a importância da vigilância contínua da resistência a antibióticos. Em relação à investigação da disseminação de OXA-48, em 2014, Manageiro et al. mostraram a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de OXA-48 em Portugal pela primeira vez. No entanto não foi possível relacionar o paciente em causa com um histórico de viagens a países endémicos e nenhum outro caso foi identificado no hospital em causa, destacando assim o potencial de disseminação entre espécies de plasmídeos portadores do gene *bla*_{OXA-48} [101].

Em 2012, Calisto et al., identificaram o gene *bla*_{KPC-3} em isolados de *K. pneumoniae* no Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE, Portugal. O gene *bla*_{KPC-3} está associado ao plasmídeo conjugativo do grupo de incompatibilidade IncF, com capacidade de conjugação entre diferentes géneros bacterianos o que facilitou a aquisição entre estirpes do género de *Klebsiella* e outras espécies bacterianas provenientes de diferentes serviços nesta unidade hospitalar [102]. Não foi só em Lisboa que o gene *bla*_{KPC-3} foi identificado. Vubil et al., identificaram o gene *bla*_{KPC-3} em isolados de *K. pneumoniae* no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal, também associado a plasmídeo conjugativo do grupo de incompatibilidade IncF e eficientemente transferido para *E. coli* J53 [104]. Também, Rodrigues et al., identificaram *K. pneumoniae* produtoras de KPC-3, em pacientes não hospitalizados geograficamente dispersos em Portugal [103].

Por fim, e tendo em conta que a administração de colistina é realizada como último recurso de tratamento, estamos perante uma ameaça na saúde pública em Portugal uma vez que já foi detetado a presença do gene *mcr-1* mediado por plasmídeo, que leva à resistência à colistina, nos seguintes estudos: (1) Figueiredo et al., detetaram em *Salmonella enterica* isolada de amostras alimentares de origem animal em Portugal, em 2016 [105]; (2) Campos et al., detetaram em *Salmonella* em amostras clínicas, animais de

consumo e água, em 2016 [106]; (3) Tacão et al., detetaram em *E.coli* num paciente internado na unidade de terapia intensiva no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE, Aveiro, Portugal, em 2017 [107]; (4) Kieffer et al., detetaram em *E.coli* e *K. pneumoniae* em suínos em Portugal em 2017 [108] e (5) Mendes et al., detetaram em *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases em pacientes hospitalizados no Centro Hospitalar do Porto [109].

1.10. Objetivos e hipóteses

A obtenção de uma boa compreensão das bases moleculares no desenvolvimento da resistência aos antibióticos é uma chave importante para a seleção de terapia adequada, para melhorar as medidas de controlo de infeção e, também, para criar novas estratégias para o desenvolvimento de novas opções de tratamento.

A realização do presente estudo foi motivado pela emergência de estirpes *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenemos e colistina no Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC) e Centro Hospitalar Médio Tejo (CHMT), em Portugal. Colocou-se a hipótese de que a resistência a carbapenemos seria mediada pela KPC-carbapenemase e OXA-48 (sugerido por dados do hospital), cujo determinante poderia ser inserido em um plasmídeo conjugativo, contribuindo para a sua propagação, e que a resistência à colistina seria mediada por genes de resistência inseridos em plasmídeos (do tipo *mcr*) com potencial de disseminação.

Assim, os principais objetivos deste estudo foram identificar genes que codificam carbapenemases e avaliar a sua capacidade de disseminação em isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenemos e detetar genes de resistência à colistina do tipo *mcr* entre os isolados colistina-resistentes, recolhidos entre 2016 e 2017 em pacientes admitidos no CHUC e CHMT, em Portugal.

De modo mais específico, o presente estudo passa pela realização da tipagem dos isolados, realização de conjugação para avaliar a transferência de genes em estirpes diferentes, identificar plasmídeos caso existam e, se não detetados genes do tipo *mcr*, pesquisa de mutações nos genes cromossomais que promovem resistência à colistina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Isolados clínicos

No presente estudo, uma coleção de 28 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemos e/ou colistina, colhidos de 2016 a 2017 em amostras clínicas de pacientes admitidos no CHUC e CHMT, Portugal, foram caracterizados. O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal.

2.2. Conservação dos isolados

No laboratório, os isolados foram conservados em meio de cultura com glicerol a 15% a -20°C. Para as culturas de rotina, foram semeados em agar Trypticase de Soja (TSA) e/ou Gelose de Sangue e incubados a 37°C durante 18-24h, e mantidos em TSA.

2.3. Teste de suscetibilidade antimicrobiana e deteção fenotípica de β -lactamases

Alguns isolados demonstraram ser resistentes a carbapenemos de acordo com os resultados de suscetibilidade antimicrobiana obtidos a partir do sistema automatizado (Vitek 2 Advanced Expert System - AES, BioMérieux, Portugal) utilizado pelos hospitais, com base nas normas de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) [110].

O método utilizado para a identificação bacteriana foi o kit API20E (BioMérieux). Resumidamente, uma suspensão bacteriana com uma turbidez de 0,5 McFarland, foi colocada nas cúpulas das tiras do kit de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente, este foi colocado a 37°C durante 18-24 horas. Findado o período de

incubação foram analisados os resultados, segundo as diretrizes do fabricante, e identificada a bactéria ao nível da espécie.

O método de difusão do disco (método de Kirby-Bauer) foi utilizado para testar a suscetibilidade a antibióticos selecionados e para detecção fenotípica de ESBLs e carbapenemases. Resumidamente, uma suspensão bacteriana com uma turbidez de 0.5 McFarland foi espalhada com zaragatoa numa placa de agar Mueller-Hinton (MH), e posteriormente, foram colocados os discos de antibióticos na placa e incubada durante 18-24 horas a 37°C. Os isolados foram testados quanto à associação amoxicilina/ácido clavulânico (20+10 µg), ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg), imipenemo (10µg), ertapenemo (10µg) (OXOID) [51]. A interpretação foi realizada de acordo com as diretrizes da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [51], uma vez que os discos tinham a quantidade de antibiótico referido nas normas CLSI.

A confirmação fenotípica de ESBLs foi realizada usando o teste de sinergia de disco dupla (DDST) com ceftazidima e cefotaxima. Estes discos foram colocados a 15mm do disco centrado de amoxicilina/ácido clavulânico. Uma zona de inibição da ceftazidima ou cefotaxima aumentada com prolongamento para o ácido clavulânico é considerada como um teste positivo para ESBL.

2.4. Detecção molecular e identificação de β -Lactamases

A PCR foi aplicada como método confirmatório para a detecção de ESBLs [43] e para confirmar a suspeita de produção de carbapenemases KPC e OXA-48. A extração de ADN foi realizada usando a metodologia de extração rápida com uma cultura de células bacterianas de 18-24h. Estas foram suspensas em 200µl de água destilada estéril em um tubo Eppendorf esterilizado de 1.5ml, depois vortexado e aquecido a 100°C durante 15 minutos no equipamento DryBlock Thermostat para lisar as células bacterianas, e centrifugado a 13000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi removido para um novo tubo Eppendorf e armazenado a -20°C para usar como ADN *template* para todos os testes.

A PCR para a detecção de genes de β -lactamases foi realizado numa mistura com volume final de 50 μ l de reacção contendo: 25 μ l solução Master Mix 2X (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal), 21 μ l de Water nuclease-free (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal), 1 μ l (10 μ M) de cada primer (F, *foward* e R, *reverse*) e 2 μ l de DNA. Um controlo positivo da coleção da FFUC e controlo negativo (água) foram incluídos em cada reacção de amplificação. Todas as amplificações de PCR foram realizadas no aparelho T1 thermocycler Biometra (Alfagene, Portugal).

As condições de amplificação foram para:

- o gene *bla*_{KPC}: desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, *annealling* a 62°C durante 45 segundos e extensão a 72°C durante 90 segundos e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. O controlo positivo foi a estirpe *Klebsiella pneumoniae* ST15 produtora de KPC-3 isolada no CHUC previamente sequenciada [104].
- o gene *bla*_{OXA-48}: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 25 segundos, *annealling* 52°C durante 45 segundos e extensão 72°C durante 50 segundos e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. Foi usado como controlo positivo um ADN de *K. pneumoniae* isolada na Tunísia previamente sequenciado (Ben Cheikh et al, manuscrito em preparação).
- os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 29 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealling* a 56°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos [97].

Os produtos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose a 1% e depois visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio. Confirmado o tamanho dos amplicões por comparação de peso molecular DNA ladder 100bp (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal) e controlo positivo, estes foram purificados para sequenciação. A purificação de amplicões foi feita misturando 10,71 μ l do produto de PCR amplificado e 4.29 μ l de Exostar 1-Step IllustraTM (GE Healthcare Life Sciences) (por cada 5 μ l de produto de PCR amplificado, adicionar 2 μ l de Exostar, sendo necessário um volume total de amostra de Exostar de 15 μ l para cada sentido a sequenciar) em tubos de

PCR e incubados a 37°C por 15 minutos, seguido de passo de inativação de enzima a 80°C por 15 minutos. As sequências dos primers e o tamanho do amplicão para TEM, SHV, CTX, KPC e OXA-48 estão descritos no Anexo 1 [97], [111], [112].

Após purificação, os amplicões foram sequenciados na STABVIDA, Caparica, Portugal. O *software* BLAST disponível *online* foi utilizado para identificar as sequências de nucleótidos.

2.5. Teste de suscetibilidade antimicrobiana e deteção fenotípica de resistência à colistina

Alguns isolados foram resistentes à colistina de acordo com os resultados de suscetibilidade antimicrobiana obtidos a partir do sistema automatizado (Vitek 2 Advanced Expert System - AES, BioMérieux, Portugal) utilizado pelos hospitais, com base nas normas de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) [110].

O método de Kirby-Bauer foi utilizado para o teste de suscetibilidade à colistina. Resumidamente, uma suspensão bacteriana com uma turbidez de 0.5 McFarland foi espalhada numa placa agar MH e posteriormente foi colocado o disco de colistina (10µg) (OXOID) e incubada durante 18-24 horas a 37°C. A interpretação foi realizada de acordo com as diretrizes do CLSI [51].

2.6. Deteção de genes associados à resistência à colistina

A obtenção de ADN bacteriano e a mistura para a reação de PCR foram executados como anteriormente indicado (ver subcapítulo 2.4).

A amplificação de genes *mcr* foi feita com primers desenhados (*mcr-3* e *mcr-5*) e de artigos publicados (*mcr-1*, *mcr-2* e *mcr-4*), uma vez que um PCR Multiplex para deteção destes cinco genes estava a ser desenvolvido no laboratório (não publicado). Como o multiplex ainda não estava otimizado, a deteção destes genes foi realizada por PCR

simples para cada gene com controlos positivos. As condições de reação de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, *annealling* a 54°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. Todas as amplificações de PCR foram realizadas no aparelho T1 thermocycler Biometra (Alfagene, Portugal). Os produtos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose a 1% e depois visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. O controlo positivo para *mcr-1* fazia parte da coleção da FFUC (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium Sal 25, Figueiredo et al. 2016, e os restantes foram gentilmente cedidos por Dr. Xavier et al. (controlo positivo para *mcr-2*), Dr. Yin et al. (controlo positivo para *mcr-3*), Dr. Carattoli et al. (controlo positivo para *mcr-4*) e Dr. Borowiak et al. (controlo positivo para *mcr-5*) [79]–[82], [105].

A reação de amplificação da sequência de inserção de inativação para o gene cromossómico *mgrB* foi: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, *annealling* a 54°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos, como descrito por Cannatelli et al., 2013 [77]. Todas as amplificações de PCR foram realizadas no aparelho T1 thermocycler Biometra (Alfagene, Portugal). Os produtos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose a 1% e depois visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio.

O procedimento de purificação dos amplicões e análise da sequenciação foi feito como anteriormente descrito. As sequências dos primers e o tamanho dos amplicões para os genes testados estão descritos no Anexo 2.

2.6.1. Desenho dos primers para *mcr-3* e *mcr-5*

Como referido no subcapítulo anterior os primers utilizados para deteção dos genes *mcr-3* e *mcr-5* foram desenhados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O procedimento foi o seguinte:

1. Aceder ao GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) e retirar a sequência do gene. Os números de acesso encontram-se nos artigos respectivos Yin et al. 2017, (para o *mcr-3*, nº de acesso KY924928) e Borowiak et al. 2017 (para o *mcr-5*, nº de acesso KY807921) [80], [82].
2. Identificar e seleccionar a sequência dos *mcr* dentro da sequência fornecida pelos números de acesso.
3. Aceder ao programa Primer 3 (<http://primer3.ut.ee>) e colar a sequência anteriormente seleccionada. Escolher o tamanho do primer (que deverá variar entre 17 e 24 pares de bases sendo 20 pares de base o valor óptimo) e escolher o tamanho do amplicão (consoante o que se pretende).
4. Fornecido as características pretendidas, segue-se a análise da lista possível de primers que é fornecida. Deverá ser escolhido um primer que termine em C ou G pela ligação que acarreta ser mais forte.
5. Aceder ao programa Oligoanalyser (<https://eu.idtdna.com/calc/analyser>) e colar a sequência do primer que cumpriu os requisitos anteriormente pretendidos. Neste programa deve-se analisar o conteúdo Delta G (que deverá ser > 4 Kcal/mol), os pares de bases (em que a diferença dos pares de base deverá ser < 4) e quantidade de hairpin's (que deverá ser < 4 ligações).
6. Findado a análise das características pretendidas, obtemos o primer óptimo.

2.7. Testes de conjugação

O método de conjugação foi usado para verificar o potencial de transferência de plasmídeos com genes portadores de resistência de antibióticos. Os isolados de *K. pneumoniae* que transportavam β -lactamases KPC e OXA-48 foram utilizados como estirpes dadoras, enquanto a estirpe resistente a azida de sódio *E. coli* J53 foi utilizada como célula recetora.

Foram realizados vários métodos de conjugação (1,2 e 3), em meio líquido e em meio sólido, sendo que as placas de seleção foram preparadas do seguinte modo:

1. O meio de cultura MH liofilizado foi pesado e adicionou-se água destilada numa proporção de 36g de MH liofilizado para 1 litro de água destilada, num frasco estéril.
2. O meio de cultura foi levado à autoclave (121°C, 15 minutos) para esterilização.
3. O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri estéreis com azida de sódio (100µg/ml), ceftazidima (4µg/ml) ou imipenemo (1µg/ml). Nas placas de seleção destinadas a controlos adicionou-se em cada uma apenas um destes compostos e nas placas de seleção destinadas às diluições adicionou-se uma mistura de azida de sódio com ceftazidima ou azida de sódio com imipenemo.

Métodos de conjugação

Método 1.

No primeiro dia do ensaio, os isolados seleccionados (Kp4, Kp5, Kp6, Kp7) e a estirpe receptora (*E. coli* J53) foram repicados em meio de cultura TSA e incubados a 37°C por um período de 18-24h para obter culturas frescas.

Então, uma colónia da dadora e da recetora foi inoculada em tubos de ensaio contendo 5ml de caldo de Trypticase de Soja (TSB) e incubada a 37°C por um período de 18-24h.

Após o período de incubação, 1ml da estirpe receptora *E. coli* J53 foi misturado com 100µl da estirpe dadora (1:10) em tubos de vidro esterilizados e incubado a 37°C por um período 18-24 horas.

Depois disso, a mistura foi suspensa água milliQ estéril e realizadas as diluições 10^0 , 10^{-2} e 10^{-4} . Em seguida, 20µl das soluções bacterianas foram plaqueados com esferas de vidro esterilizadas em placas de seleção MH com azida de sódio (100µg/ml) e ceftazidima (4µg/ml) e incubadas 18-24 horas a 37°C.

Método 2.

Este método 2 foi realizado do mesmo modo anteriormente referido no método 1 variando na utilização de placas de seleção em que a ceftazidima foi substituída por imipenemo (1µg/ml).

Método 3.

O método 3 foi realizado do mesmo modo que o método 1 anteriormente descrito, variando deste após repicagem em TSB, em que os isolados selecionados e a estirpe receptora foram levados a um termo-agitador a 37°C por um período de 4h.

Após o período de incubação, 1ml da estirpe receptora *E. coli* J53 foi misturado com 100µl da estirpe dadora sobre placas contendo meio de cultura MH e incubados a 37°C por um período 18-24 horas.

Findado o período de incubação, as diluições foram realizadas de acordo com o descrito no método 1 e foram usadas placas de seleção com imipenemo (1µg/ml) e ceftazidima (4µg/ml).

Após a incubação, foi extraído DNA de colónias bacterianas (transconjugantes) e armazenado para posterior PCR para deteção de β-lactamases específicas.

2.8. Tipagem molecular de isolados bacterianos e plasmídeos

A avaliação da relação genética entre os isolados Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7 foi realizada por MLST.

2.8.1. MLST

Os isolados produtores de OXA-48 e/ou KPC recolhidos em enfermarias hospitalares do CHUC e CHMT e com diferentes datas de colheita foram selecionados para avaliar a sua relação clonal. Assim, a sequência de sete genes *housekeeping* (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* e *tonB*) foi determinada em ambos os sentidos para os isolados Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7, após amplificação com *primers* específicos (Anexo 3), como descrito em http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.htm [113].

O PCR para cada gene *housekeeping* foi realizado um volume final de 50µl de reação, contendo 25µl de solução Master Mix 2X (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal), 21µl de Water nuclease-free (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal), 1µl (10µM) de cada primer (*forward* e *reverse*) e 2µl de DNA. As condições de amplificação foram realizadas com o passo inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 50°C durante 30 segundos, exceto *gapA* (60°C) e *tonB* (45°C), 72°C por 30 segundos e extensão final de 5 minutos a 72°C [113]. As amplificações de PCR para *gapA* foram realizadas no aparelho Thermal Cycler MJ Mini (BioRad), para *tonB* no aparelho Tpersonal Biometra e T1 thermocycler Biometra (Alfagene, Portugal) e para os restantes genes no aparelho T1 thermocycler Biometra (Alfagene, Portugal).

Para os isolados Kp4 e Kp6, o gene *tonB* foi testado com diferentes condições de PCR, uma vez que não se conseguiu amplificação como descrito anteriormente. Assim, testou-se com 2µl de DMSO (Thermo Scientific), 2µl de BSA (BioLabs) e 2µl de MgCl₂ (Finnzymes) a 50µM.

Os produtos amplificados foram separados em eletroforese em gel de agarose a 1% e depois visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio.

O procedimento de purificação dos amplicões e análise da sequenciação foi feito como anteriormente descrito no sub-capítulo 2.4, sendo que a sequenciação foi feita em ambos os sentidos. A numeração da sequência do alelo e o alinhamento das ST foram realizados através da base de dados MLST de *K. pneumoniae* (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

As sequências dos *primers* e o tamanho dos amplicões estão referenciados no Anexo 3.

2.8.2. Tipagem de plasmídeos do grupo Inc

A tipagem de plasmídeos foi realizada para identificar os plasmídeos de resistência mais comuns de Enterobactérias, de acordo com o método de Carattoli et al (2005) [93].

O protocolo PBRT foi realizado para identificar os grupos de plasmídeos Inc mais comuns ocorrendo entre *Enterobacteriaceae*, nomeadamente FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, L / M, N, P, W, T, A / C, K, B / O, X, Y, F e FIIA [93]. As sequências primárias e o tamanho do amplicão são apresentados no Anexo 4.

Todos os ensaios de PCR foram realizados em um volume de reação total de 20µl contendo 10µl de solução Master Mix 2X (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal), 8µl de Water nuclease-free (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal), 1µl (10µM) de cada primer (*forward* e *reverse*) e 1µl de DNA. A reação de amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, annealing a 60°C com exceção para o replicação IncF (52°C) por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos [93]. Todas as amplificações de PCR foram realizadas no aparelho T1 thermocycler Biometra (Alfagene, Portugal). Finalmente, os produtos de PCR foram separados correndo um gel de agarose a 1% e visualizados através de luz UV após coloração com brometo de etídio.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização dos isolados bacterianos

No presente estudo, um número total de 28 isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemos e/ou colistina colhidos em 2016 e 2017, de 26 pacientes admitidos no CHUC e CHMT, foram caracterizados fenotípica e geneticamente. De dois pacientes, foram recolhidos de amostras clínicas e datas diferentes dois isolados, e daí a diferença entre o número de isolados e doentes.

Os isolados analisados foram colhidos de diferentes tipos de amostras: urina (n=14; 50,00%), aspirado brônquico (n=5; 17,86%), exsudados de ferida cirúrgica ou não cirúrgica (n=5; 17,86%), expetoração (n=2; 7,14%), pus de abcesso (n=1; 3,57%) e sangue (n=1; 3,57%) (Fig.1), de 12 enfermarias hospitalares: Urgência (n=6; 21,43%), Neurocirurgia (n=4; 14,29%), Queimados (n=4; 14,29%), Medicina interna (n=3; 10,71%), Medicina Geral (n=2; 7,14%), Medicina Intensiva (n=2; 7,14%), Transplante Renal (n=2; 7,14%), Cirurgia (n=1; 3,57%), Hematologia (n=1; 3,57%), Cardiologia (n=1; 3,57%), Urologia (n=1; 3,57%) e Nefrologia (n=1; 3,57%) (Fig. 2).

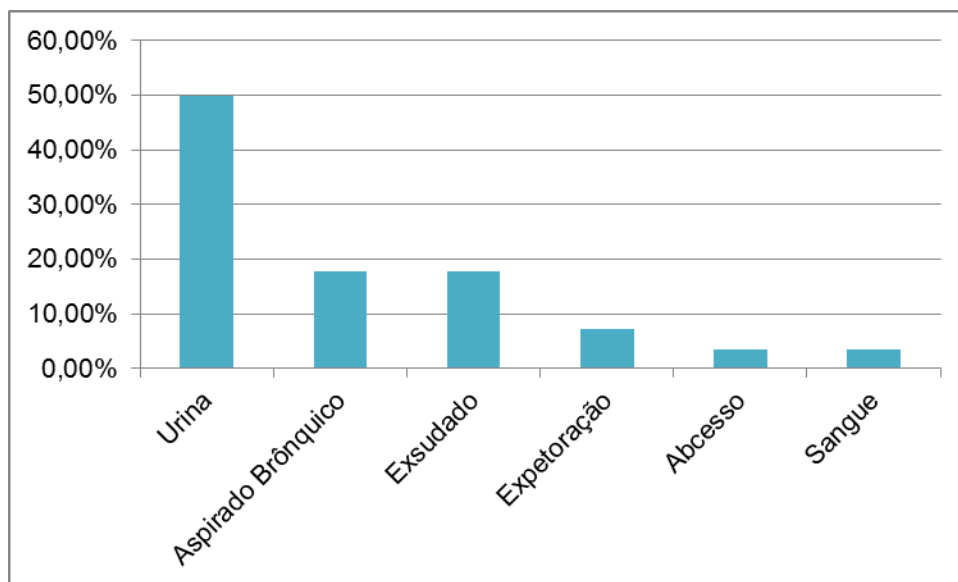


Figura 1: Amostras clínicas de onde foram identificados 28 isolados *K. pneumoniae*. Urina (n=14), aspirado brônquico (n=5), exsudados de ferida cirúrgica ou não cirúrgica (n=5), expetoração (n=2), pus de abcesso (n=1) e sangue (n=1).

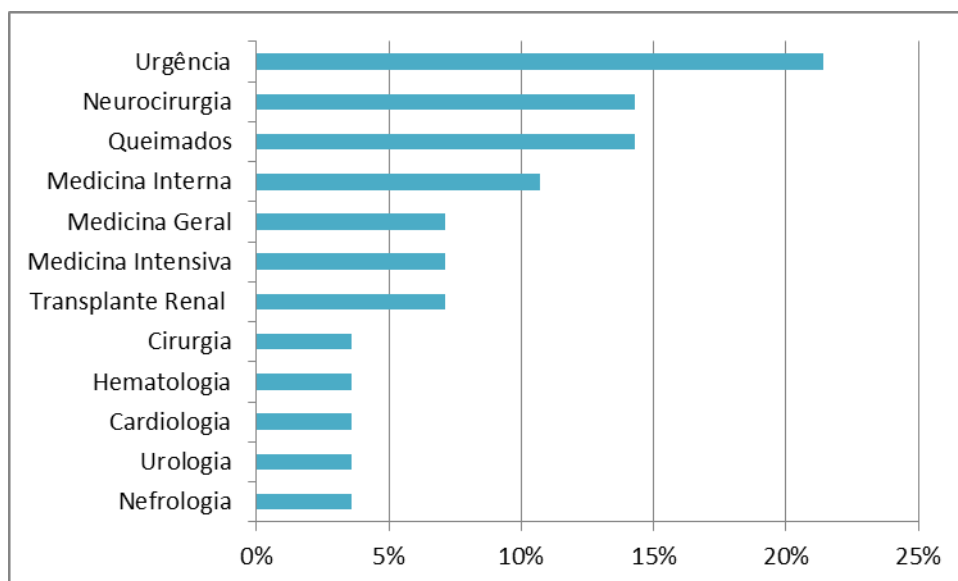


Figura 2: Distribuição das diferentes enfermarias hospitalares dos 28 isolados de *K. pneumoniae*.

A idade estava disponível para todos pacientes e variou para o sexo feminino de 48 a 89 anos, com uma média de 73 anos (n=14), enquanto o sexo masculino variou de 28 a 89 anos com uma média de 62 anos (n=12) (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição por género e idades dos 26 pacientes com infeção por *K. pneumoniae*.

Género			
Feminino (n=14; 53,85%)		Masculino (n=12; 46,15%)	
Idade (anos)		Idade (anos)	
Intervalo	Média	Intervalo	Média
48-89	73	28-89	62

3.2. Crescimento bacteriano

Todos os isolados bacterianos cresceram em meio TSA à exceção do isolado Kp1 e Kp6. Após ausência de crescimento em meio TSA, o isolado Kp1 foi repicado para TSB, com agitação, e posteriormente para uma placa contendo meio TSA no qual se observou crescimento. Relativamente ao isolado Kp6, este foi repicado para uma placa contendo gelose de sangue após ausência de crescimento em placa contendo meio TSA. Em gelose de sangue houve crescimento e, posteriormente, foi repicado para TSA verificando-se crescimento do isolado. As colónias apresentaram-se globosas, brilhantes e mucosas. A Fig. 3, mostra a cultura de um isolado em meio TSA.



Figura 3: Cultura de um isolado *K. pneumoniae* em meio TSA.

3.3. Identificação bacteriana

No geral, as colónias apresentaram-se como referenciado no subcapítulo 3.2. No entanto, após crescimento em meio TSA e pelas características das colónias, que se apresentaram pequenas e pouco mucosas, foi utilizado o kit API20E (BioMérieux) para a identificação bacteriana do isolado em causa, o isolado Kp6. O resultado confirmou que o isolado Kp6 era *K. pneumoniae*.

3.4. Suscetibilidade aos antibióticos

Os antibiogramas realizados no hospital, obtidos a partir do sistema automatizado (Vitek 2 Advanced Expert System - AES, BioMérieux, Portugal), foram cedidos, mas nem todos apresentavam os mesmos antibióticos (uso de diferentes cartas).

Nos antibiogramas hospitalares, observou-se que todos os isolados eram resistentes a mais de uma classe de antibióticos, a maioria apresentava resistência aos beta-lactâmicos,

incluindo carbapenemos, quinolonas, e aminoglicosídeos, podendo ser considerados “extremamente resistentes” (XDR). A maioria dos isolados resistentes à colistina apenas mostrava suscetibilidade à tigeciclina.

Devido ao uso de diferentes cartas de Vitek, alguns isolados não foram testados para alguns antibióticos pelo que se procedeu no laboratório ao teste de difusão em disco. A Tabela 2 mostra os resultados da suscetibilidade dos antibióticos em falta determinada pelo método de difusão em disco.

Tabela 2: Resultado dos testes de suscetibilidade dos isolados Kp6, Kp7, Kp14 e Kp27 pelo método de difusão em disco.

Isolado	Medição da zona do halo (mm)					
	AMC	CAZ	CTX	IPM	CT	ETP
Kp6	NT	NT	NT	23 (S)	NT	NT
Kp7	9 (R)	15 (R)	7 (R)	23 (S)	13 (S)	18 (R)
Kp14	NT	NT	NT	16 (R)	NT	NT
Kp27	12 (R)	0 (R)	0 (R)	22 (I)	NT	NT

NT – Não testado; S – Sensível; I – Intermédio; R – Resistente; Amoxicilina-clavulânico (AMC), Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Imipenemo (IPM), Ertapenemo (ETP) e Colistina (CT).

A fig. 4 mostra um exemplo de teste de suscetibilidade de um isolado *K. pneumoniae*.

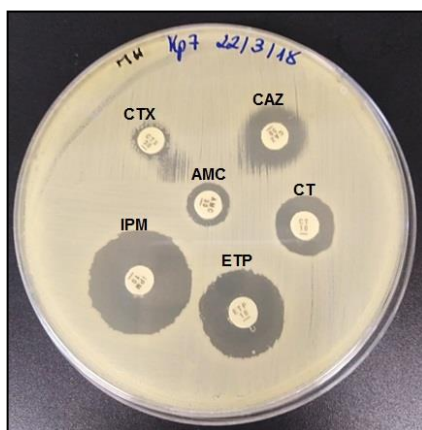


Figura 4: Antibiograma de um isolado *K. pneumoniae* por método de Kirby-Bauer. Amoxicilina-clavulânico (AMC), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), imipenemo (IPM), ertapenemo (ETP) e colistina (CT).

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos 28 isolados clínicos de *K. pneumoniae* está resumido na Fig.5. Todos os isolados eram resistentes à combinação **amoxicilina e ácido clavulânico** e observou-se elevada frequência de resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos de espectro alargado testados (cefalosporinas e carbapenemos) e a colistina. Os isolados mostravam também resistência a outras classes de antibióticos como quinolonas e aminoglicosídeos (dados do hospital não mostrados).

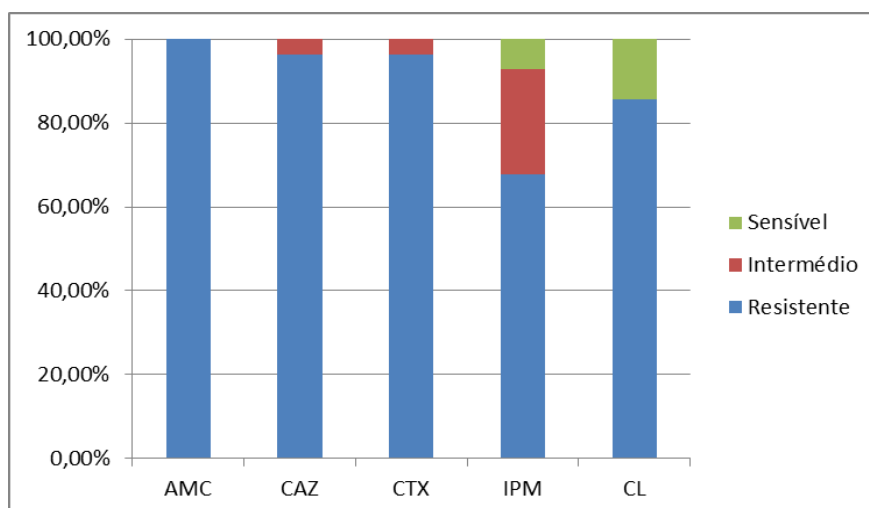


Figura 5: Perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos 28 isolados *K. pneumoniae*. AMC (amoxicilina e ácido clavulânico), CAZ (ceftazidima), CTX (cefotaxima), IPM (imipenemo) e CL (colistina).

3.5. Organização dos isolados

Os 28 isolados foram divididos em dois grupos para posterior estudo:

- Grupo 1, que compreende sete isolados presuntivamente produtores das carbapenemases OXA-48 e/ou KPC (Kp1-Kp7), e o isolado Kp27.
- Grupo 2, que compreende 24 isolados resistentes à colistina (Kp2, Kp3, Kp4, Kp8-Kp28).

Quatro dos 28 isolados (Kp2, Kp3, Kp4 e Kp27) foram investigados nos dois grupos.

3.6. Resultados do Grupo 1

3.6.1. Detecção e identificação de β -lactamases nos isolados

Os sete isolados (Kp1-Kp7) resistentes a carbapenemos presuntivamente produtores de OXA-48 e/ou KPC (informação hospitalar), foram sujeitos a deteção molecular das β -lactamases OXA-48 e KPC.

Todos os isolados pertencentes ao grupo 1, com exceção do isolado Kp7, que foi colhido de um paciente admitido no CHMT, eram isolados colhidos de pacientes admitidos no CHUC. De realçar que, os isolados Kp5 e Kp6 foram colhidos do mesmo paciente (paciente X), assim como os isolados Kp4 e Kp27 (paciente Y), e por esta razão, o isolado Kp27 também foi sujeito a deteção molecular de OXA-48 e KPC, perfazendo um total de oito isolados nesta análise. Os pacientes X e Y tinham sido transferidos de hospitais da região de Lisboa para a unidade de Queimados do CHUC, sendo que ambos padeciam de Doença de Lyell.

Por PCR observou-se que os isolados Kp4, Kp6 e Kp7 continham o gene *bla*_{OXA-48} e o isolado Kp5 continha o gene *bla*_{KPC}. Após sequenciação o gene presente nos isolados Kp4, Kp6 e Kp7 foi identificado como sendo *bla*_{OXA-181} e o gene presente no isolado Kp5 foi identificado como sendo *bla*_{KPC-3}.

No isolado Kp4, só foi possível observar a amplificação do gene *bla*_{OXA-181}, aquando utilizado na deteção molecular, foi usado o ADN fresco deste isolado, isto é, sem que este tenha sofrido processo de congelação.

Após o processo de deteção molecular e identificação das variantes das β -lactamases do tipo OXA-48 e KPC, os isolados Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7 foram sujeitos à deteção fenotípica de ESBLs pelo método DDST, verificando-se que os mesmos eram produtores de ESBLs (Fig. 6) sendo, portanto, posteriormente sujeitos a deteção molecular de ESBLs do tipo SHV, TEM, e CTX-M, as mais frequentemente reportadas.

Por PCR observou-se que todos os isolados (Kp4-Kp7) produtores de OXA-48 e/ou KPC continham o gene *bla*_{SHV}, que os isolados Kp4, Kp5, e Kp7 continham o gene *bla*_{CTX-M} e que os isolados Kp4 e Kp5 continham o gene *bla*_{TEM}. Após sequenciação o gene *bla*_{SHV} presente foi identificado como sendo *bla*_{SHV-1} para o isolado Kp4 e *bla*_{SHV-11} para os isolados Kp5, Kp6 e Kp7; o gene *bla*_{CTX-M} foi identificado como sendo *bla*_{CTX-M-15} e o gene *bla*_{TEM} identificado como sendo *bla*_{TEM-1}.

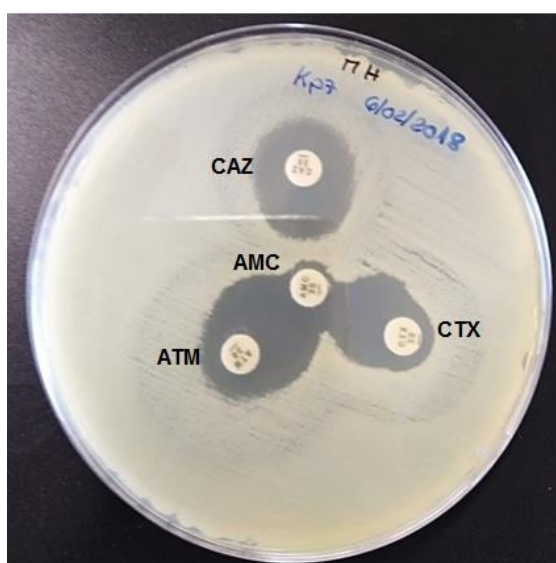


Figura 6: Antibiograma ilustrando um isolado *K. pneumoniae* produtor de ESBL. Observa-se uma zona de inibição aumentada entre o disco central amoxicilina-clavulânico (AMC) e os discos ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX) e aztreonam (ATM).

3.6.2. Teste de conjugação

Os ensaios de conjugação (por três métodos diferentes) foram realizados para os isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases do tipo OXA-48 e KPC (Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7).

No método 1, os controlos dos respetivos isolados e bactéria recetora apresentaram-se de forma correta: as dadoras Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7 cresceram nas placas de seleção só com ceftazidima e não cresceram nas placas de seleção só com azida de sódio, enquanto a recetora *E.coli* J53 não cresceu na placa só com ceftazidima mas cresceu na placa de seleção só com azida de sódio, validando assim o teste. Nas placas de seleção não se observou o crescimento de transconjugantes.

No método 2, os controlos dos respetivos isolados e bactéria recetora apresentaram-se de forma incorrecta, uma vez que houve crescimento da estirpe *E.coli* J53 na placa de seleção com ceftazidima.

Uma vez que no método 1 não se verificou crescimento de transconjugantes e no método 2 os controlos se apresentaram de forma incorreta, recorreu-se ao método 3, geralmente utilizado para microrganismos com maior dificuldade em conjugar.

No método 3, os controlos dos isolados Kp4, Kp5, Kp6, Kp7 e *E.coli* J53 originaram resultados corretos, o que permitiu validar estes testes. Observou-se crescimento de transconjugantes apenas nas placas de seleção com azida de sódio e ceftazidima dos isolados Kp4, Kp5 e Kp7 (diluição 10^{-2}). A exceção foi o isolado Kp6 que em nenhuma das placas apresentou crescimento.

Foi extraído o ADN dos transconjugantes obtidos nos testes de conjugação de ceftazidima com azida de sódio, para posterior deteção de β -lactamases (OXA-48 e KPC) e ESBLs (SHV, CTX-M e TEM).

3.6.3. Detecção molecular e identificação de β -lactamases nos transconjugantes

Nos transconjugantes obtidos pelo teste de conjugação fez-se a detecção molecular das β -lactamases OXA-48, KPC, SHV, CTX-M e TEM concluindo que uma vez já sequenciados anteriormente, foram transferíveis os genes *bla*_{SHV-1}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{TEM-1} do isolado Kp4 mas não o gene *bla*_{OXA-181}; os genes *bla*_{KPC-3}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{TEM-1} do isolado Kp5 e os genes *bla*_{OXA-181}, *bla*_{SHV-11} e *bla*_{CTX-M-15} do isolado Kp7 para *E.coli* J53.

3.6.4. Tipagem de plasmídeos do grupo Inc

A tipagem de plasmídeos foi realizada para os isolados Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7.

Todos os isolados revelaram ausência dos grupos Inc: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, L / M, N, P, W, T, A / C, K, B / O, X, Y, F e FIIA.

3.6.5. Tipagem molecular de isolados bacterianos

A avaliação da relação genética entre os isolados Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7 foi realizada por MLST.

Nos isolados Kp4 e Kp6, não se verificou amplificação do gene *tonB* em nenhuma das condições descritas no subcapítulo 2.8.1. aquando utilização do aparelho Tpersonal Biometra (Alfagene, Portugal). No entanto, todas estas condições permitiram amplificação do gene *tonB* por utilização do aparelho T1 thermocycler Biometra (Alfagene, Portugal).

Os resultados mostraram três perfis de MLST diferentes: ST15, ST348 e ST17, para os isolados Kp4, Kp5 e Kp7, respetivamente. No isolado Kp6 não foi possível determinar a ST, uma vez que a combinação destes alelos não está descrita na base de dados.

Na tabela 3 estão resumidos os dados referentes aos isolados Kp4, Kp5, Kp6, Kp7 e Kp27.

Tabela 3: Resumo dos dados analisados dos isolados Kp4, Kp5, Kp6, Kp7 e Kp27.

<i>Isolado</i>	<i>Paciente</i>	<i>Hospital (entrada hospitalar)</i>	<i>Hospital (colheita do isolado)</i>	<i>Enfermaria</i>	<i>Patologias associadas</i>	<i>Colheita</i>	<i>Amostra</i>	<i>Perfil de resistência antimicrobiana (carbapenemos e colistina)</i>	<i>β-lactamases identificadas nos isolados</i>	<i>β-lactamases detectadas nos transconjugantes</i>	<i>Tipagem de plasmídeos (Grupo Inc)</i>	<i>MLST</i>
Kp4	Y	Lisboa	CHUC	Queimados	DL	24-05-2017	AB	IMP; ETP; MER; CL	OXA-181; SHV-1; CTX-M-15; TEM-1	SHV-1; CTX-M-15; TEM-1	-	ST15
Kp27	Y	Lisboa	CHUC	Queimados	DL	31-05-2017	U	ETP; CL	-	NT	NT	NT
Kp5	X	Lisboa	CHUC	Queimados	DL	17-05-2017	EFNC	IMP; ETP; MER	KPC-3; SHV-11; CTX-M-15; TEM-1	KPC-3; SHV-11; CTX-M-15; TEM-1	-	ST348
Kp6	X	Lisboa	CHUC	Queimados	DL	20-05-2017	AB	ETP	OXA-181; SHV-11	NT	-	ND
Kp7	Z	CHMT	CHMT	Medicina Interna		06-06-2017	AB	ETP	OXA-181; SHV-11; CTX-M-15	OXA-181; SHV-11; CTX-M-15	-	ST17

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra; CHMT – Centro Hospitalar Médio Tejo; DL – Doença de Lyell; AB – Aspirado Brônquico; EFNC – Exsudado de ferida não cirúrgica; U – Urina; IMP – Imipenemo; ETP – Ertapenemo; MER – Meropenemo; CL – Colistina; (-) – Negativo; MLST - *Multilocus sequence typing*; ST – Tipo de Sequência; NT – Não testado; ND – Testado, Não Determinado. Possível nova ST.

3.7. Resultados do Grupo 2

3.7.1. Detecção de genes de resistência à colistina

Dos 28 isolados, 24 (Kp2, Kp3, Kp4, Kp8 a Kp28) resistentes à colistina, ou seja 85.71% do total de isolados recolhidos (Fig. 5), foram sujeitos a deteção molecular dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* numa primeira fase, e posteriormente, foram sujeitos a deteção molecular da sequência de inserção de inativação para o gene *mgrB*.

Relativamente à pesquisa dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5*, não se observou a amplificação destes genes em nenhum dos isolados resistentes à colistina.

Em 25% (6/24) dos isolados (Kp8, Kp9, Kp10, Kp17, Kp18 e Kp22) resistentes à colistina verificou-se presença da amplificação da sequência de inserção de inativação para o gene *mgrB*, sendo que nos restantes isolados compreendidos no grupo 2 não se observou a presença desta sequência de inserção de inativação.

4. DISCUSSÃO

A emergência e disseminação global de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos e/ou colistina constituem uma ameaça à saúde pública [102], [106]. Neste trabalho foi realizado o estudo molecular de isolados de *K. pneumoniae* selecionados com base na possível produção da carbapenemase OXA-48 e/ou KPC e resistência à colistina. Em Portugal, ainda são raras as descrições de resistência a carbapenemos por produção de OXA-48 e à colistina, e nunca observadas até então nos hospitais que cederam os isolados.

A maioria dos isolados foi recolhida de urina, 50% (Fig. 1). Este dado sustenta a importância clínica de *K. pneumoniae* como agente patogénico oportunista para infeções do trato urinário adquirido a nível hospitalar e na comunidade [1]. No que diz respeito à enfermaria, a que teve maior percentagem de recolha de isolados foi a Urgência (21,43%), sendo que os restantes isolados estavam distribuídos por outras enfermarias em menor percentagem. A maioria dos pacientes incluídos neste estudo tem mais de 60 anos (Tabela 1), tornando-os mais vulneráveis a infeções bacterianas. Sabe-se que o aumento da idade, tempo de permanência hospitalar ou em unidade de terapia intensiva, gravidade do quadro clínico, inserção de vários tipos de cateteres permanentes, realização de certos tipos de procedimentos invasivos ou intervenções cirúrgicas, recebimento de terapia renal substitutiva ou ventilação mecânica são importantes fatores de risco para adquirir infeções por *K. pneumoniae* [114], [115], e este estudo confirma-o.

A prevalência de resistência a antibióticos entre os isolados *K. pneumoniae* analisados é extremamente alta. Isto pode sugerir o uso extensivo de antibióticos nas práticas clínicas. As cefalosporinas de terceira geração, como cefotaxima e ceftazidima, são utilizadas mundialmente como alternativa para tratar infeções bacterianas devido à resistência mediada por penicilinas e resistência a outros grupos de antibióticos [65], enquanto carbapenemos como imipenemo, meropenemo, ertapenemo e doripenemo são recomendados como terapia de primeira linha para infeções graves devido a organismos produtores de ESBLs [52]. No entanto, devido à crescente prevalência de bactérias de

Gram-negativo resistentes aos carbapenemos (e muitos outros antibióticos), foi recentemente admitida a reintrodução da colistina como uma opção terapêutica [71].

Para facilitar a exposição dos resultados, os isolados foram agrupados em: grupo 1, onde se inseriram possíveis produtores de OXA-48 e KPC e isolados recolhidos dos mesmos doentes (n=8) e grupo 2 (n=24), isolados com resistência à colistina, sendo que quatro isolados do grupo 1 poderiam também inserir-se no grupo 2.

Os pacientes onde foram colhidos os isolados Kp4 e Kp27 (paciente Y) e os isolados Kp5 e Kp6 (paciente X) foram transferidos de hospitais da região de Lisboa para a unidade de Queimados do CHUC, ambos com Doença de Lyell. Esta é uma doença caracterizada por necrose intensa e desprendimento da epiderme devido a uma reação alérgica a um fármaco. Os isolados do paciente Y foram colhidos em dias diferentes (intervalo de sete dias) e colhidos de amostra diferentes: aspirado brônquico (Kp4) e urina (Kp27) assim como os isolados do paciente X: intervalo de 20 dias, exsudado de ferida não cirúrgica (Kp5) e aspirado brônquico (Kp6).

Neste grupo 1 foram identificadas carbapenemases em 50% (4/8) dos isolados em estudo, sendo que foi identificado o gene *bla*_{OXA-181} em 37.5% (3/8) dos isolados (Kp4, Kp6 e Kp7), e identificadas ESBLs. Estes isolados apresentavam resistência a cefalosporinas de terceira geração, com exceção de um isolado com reduzida suscetibilidade, e apresentavam resistência ou suscetibilidade reduzida ao imipenemo. Estes dados mostram que a susceptibilidade reduzida/resistência a cefalosporinas de terceira geração pode ser devida a produção de ESBLs. Para além disso, foi identificado o gene *bla*_{KPC-3} em 12.5% (1/8) dos isolados (Kp5), com resistência ao imipenemo, ertapenemo e meropenemo. As enzimas do tipo KPC hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenemos [55].

O facto de se observar resistência ao imipenemo em não produtores de carbapenemases pode ser explicado por outros mecanismos de resistência tais como falta de porinas ou mutações capazes de modificar a estrutura das proteínas das porinas e, assim, diminuir o influxo [25], [28], [29] e bombas de efluxo capazes de desenvolver um mecanismo de

transporte ativo que bombeia as moléculas de antibióticos que penetram na célula para o exterior [10].

Os isolados *K. pneumoniae* produtores de OXA-181 do presente estudo foram identificados no CHUC (dois isolados: Kp4 e Kp6) e no CHMT (um isolado: Kp7), contudo, não obtemos informação que possamos relacionar a presença do isolado no CHMT com transmissão inter-hospitalar. Também não se observou presença do gene *bla*_{OXA-181} no isolado Kp27 (isolado colhido do mesmo paciente que o isolado Kp4, paciente Y). Relativamente ao isolado Kp4, só se verificou presença de *bla*_{OXA-181}, quando usado ADN fresco deste isolado sem que este tenha sido sujeito a congelação anteriormente à deteção de OXA-48. Isto leva a ponderar a mudança de protocolo de extração de ADN por um outro método de extração que permita obter um ADN mais puro.

OXA-48 tem sido reportada em vários pontos do globo, incluindo na Europa [57]. Em Portugal, *Enterobacteriaceae* produtoras de OXA-48 foram identificadas em 2014 pela primeira vez, porém, não foi possível relacionar o paciente em causa com um histórico de viagens a países endémicos e nenhum outro caso foi reportado no hospital em causa, destacando assim o potencial de disseminação entre espécies de plasmídeos portadores do gene *bla*_{OXA-48} [101]. Os pacientes Y e X foram transferidos de hospitais da região de Lisboa, onde se detetou anteriormente a OXA-48 [101], o que confirma a disseminação inter-hospitalar de estirpes produtoras de OXA-48. Que se conheça, nenhum outro estudo foi publicado posteriormente.

O isolado *K. pneumoniae* produtor de KPC-3 foi colhido do paciente X admitido no CHUC, em 2017 sendo que em 2013, já tinha sido identificado o gene *bla*_{KPC-3} em isolados de *K. pneumoniae* no mesmo hospital [104]. Para além de identificado no CHUC, havia sido identificado em isolados nosocomiais de *K. pneumoniae* recuperados de enfermarias do Centro Hospitalar Lisboa Norte, em 2012 [102], e em isolados *K. pneumoniae* em pacientes não hospitalizados geograficamente dispersos em Portugal, em 2016 [103].

Foram identificadas ESBLs em todos os isolados *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases. As ESBLs de SHV e TEM são encontradas em todo o mundo entre

Enterobacteriaceae e são derivadas de mutações em SHV-1/2 e TEM-1/2, respetivamente, que são enzimas de espectro estreito, penicilinases [46]. Enquanto SHV-1 é produzida pela grande maioria de *K. pneumoniae*, TEM-1 e TEM-2 são β -lactamases mediadas por plasmídeos mais comumente associadas à resistência à ampicilina de Gram-negativo, principalmente *E. coli*, [46], [65]. SHV-11 é uma variante de SHV-1 [116], [117]. O gene *bla*_{SHV-11} foi identificado pela primeira vez como codificado por plasmídeos em um isolado clínico de *K. pneumoniae* na Suíça [118] e desde então tem sido isolado em todo o mundo [119]. Isto vai de encontro com prevalência de ESBLs identificadas nos isolados Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7.

No presente grupo (grupo 1) foi identificado o gene *bla*_{CTX-M-15} em três dos quatro isolados produtores de carbapenemases (Kp4, Kp5 e Kp7). Em Portugal já foi identificado o gene *bla*_{CTX-M-15} em *K. pneumoniae* de pacientes transplantados renais no CHUC [100], o hospital onde foram detetados dois isolados (Kp4 e Kp5). Também em Portugal já foram identificados o gene *bla*_{CTX-M-15} em outras espécies, nomeadamente, em *E. coli* produtoras de CTX-M-15 em hospitais de três regiões de Portugal em 2007 [97] e em *E. coli* em pacientes de hemodiálise, em 2012 [98]. A prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M está correlacionada com a disseminação global de enzimas CTX-M, o que é um enorme problema. As ESBLs do tipo CTX-M têm-se difundido globalmente, ultrapassando e parcialmente substituindo as ESBLs do tipo SHV e TEM e, tornando-se, em geral, o tipo mais prevalente de ESBLs [120], [121]. Este cenário epidemiológico incluiu o aumento do número de diferentes enzimas CTX-M e o reconhecimento de múltiplos clones e elementos genéticos portadores de genes CTX-M. Embora a TEM e a SHV tenham sido associados a clones epidémicos, a CTX-M, em contraste, pode seguir um padrão alodémico, que significa que o aumento das enzimas CTX-M não foi somente resultado da disseminação de clones particulares, mas da disseminação de múltiplos clones e/ou elementos genéticos [48].

De particular importância é a localização de genes β -lactamases em plasmídeos que facilitam a sua disseminação horizontal. Os genes *bla*_{SHV-1}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{KPC-3} dos isolados analisados foram transferidos por conjugação para *E. coli* J53, o que tem sido reportado [98], [102], [104], [122]. O gene *bla*_{OXA-181} apenas foi transferível em

um isolado, indicando risco de potencial disseminação. Num outro isolado foi possível obter transconjugantes sem *bla*_{OXA-181} na placa de seleção com ceftazidima, sugerindo localização cromossômica, e no terceiro não se observaram transconjugantes, indicando ausência de plasmídeos conjugativos ou localização cromossômica. Estes resultados realçam as variadas plataformas genéticas onde o gene *bla*_{OXA-181} pode estar inserido, e mais trabalho deverá ser realizado para identificar o ambiente genético deste gene.

No presente estudo, a tipagem de plasmídeos nos isolados sujeitos a teste de conjugação, incluindo as dadoras (Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7) mostrou ausência de plasmídeos do grupo Inc pelo esquema PBRT [93]. Embora alguns genes tenham sido transferidos, não se pode identificar o plasmídeo. Segundo Carattoli et al. afirmam que PBRT é uma ferramenta de tipagem de plasmídeos com várias limitações porque não cobre todos os grupos de Inc e também não consegue detetar novas replicões. [94].

Relativamente aos isolados produtores de OXA-181 e KPC-3 e uma vez que foi identificado o mesmo gene, *bla*_{OXA-181}, em mais que um isolado (Kp4, Kp6 e Kp7) e isolado produtor de KPC-3 (Kp5) ter sido colhido do mesmo indivíduo de um isolado produtor de OXA-181 (Kp6), foi avaliada a relação genética dos isolados Kp4, Kp5, Kp6 e Kp7 por MLST. Nos isolados Kp4 e Kp6, não se verificou amplificação do gene *tonB* em nenhuma das condições de PCR incluindo com adjuvantes da PCR (com DMSO, de BSA e MgCl₂ a 50µM), aquando utilização do aparelho Tpersonal Biometra, no entanto, todas estas condições permitiram amplificação do gene *tonB* quando utilizado o aparelho T1 thermocycler Biometra. Isto alerta que as características de cada termociclador podem ser influenciadores para uma pesquisa eficaz.

Os resultados mostraram três diferentes perfis de MLST: ST15, ST348 e ST17 para os isolados Kp4, Kp5 e Kp7, respetivamente. Quanto ao isolado Kp6 não foi possível determinar a ST, uma vez que a combinação destes alelos não está descrita na base de dados, sendo que este carece de análise pelo Instituto Pasteur, e poderá indicar um novo ST.

Os resultados do presente estudo reportam a associação de ST15 e ST17 com a presença de *bla*_{OXA-181} nos isolados Kp4 e Kp7, respetivamente e ST348 com a presença de *bla*_{KPC-3} no isolado Kp5. Adicionalmente, estes três perfis de MLST mostraram associação com a presença de *bla*_{CTX-M-15}.

Para nosso conhecimento, nenhum estudo reportou a associação do gene *bla*_{OXA-181} associado a *K. pneumoniae* ST15 e ST17 em Portugal. No entanto, a associação do *bla*_{OXA-181} e ST17 foi identificada em Singapura [53]. ST14, ST15, ST101, ST147, ST395 e ST405 têm sido reportados em muitos países. Contudo, ST11 tem sido frequentemente associado a *bla*_{OXA-48} em isolados *K. pneumoniae* [123]. Na verdade, ST11 e ST15 já foram identificados em *K. pneumoniae* associado ao gene *bla*_{KPC-3} no CHUC [104].

Embora KPC-3 seja amplamente encontrada no mundo, está associado a clones específicos para a disseminação global de KPC, nomeadamente ST258, o mais frequente [124]. No entanto o perfil de MLST ST348 já foi reportado em 2013 num surto no CHUC, Portugal [104], o mesmo hospital onde foi isolado Kp5, demonstrando que este ST continua disseminado neste hospital. De realçar, que ST348 apenas foi encontrado em África e neste hospital [104].

Dois dos três perfis de MLST reportados no presente estudo, ST15 e ST348, já foram associados ao gene *bla*_{CTX-M-15} em *K. pneumoniae* em Portugal inserido em plasmídeos conjugativos do grupo de incompatibilidade IncF [103]. Geralmente está associada ao clone ST131 de *E.coli* [125].

Assim, conclui-se que relativamente aos isolados produtores de OXA-181 não se verifica existir um clone a circular entre hospitais portugueses visto haver ST diferentes (do hospital de Tomar e de Coimbra). Este resultado realça a necessidade de controlar os doentes transferidos de outras unidades clínicas. Um dos doentes apresentava dois isolados *K. pneumoniae* com carbapenemases e ST diferentes, um provavelmente já a causar infeção aquando da transferência inter-hospitalar, e outro o produtor de KPC-3, adquirido neste hospital, com um ST já encontrado anteriormente nesta instituição [104].

Devido à crescente prevalência de bactérias de Gram-negativo resistentes aos carbapenemos (e muitos outros antibióticos), foi recentemente admitida a reintrodução da colistina como uma opção terapêutica [71]. Infelizmente, o uso aumentado e inadequado de colistina levou inexoravelmente ao surgimento mundial de bactérias resistentes à colistina [74]. No presente estudo, verificou-se que começam a emergir estirpes de *K. pneumoniae* resistentes à colistina nos CHUC.

Até 2015, a resistência à colistina sempre foi associada a um mecanismo cromossômico com reduzida possibilidade de transferência horizontal [75]. Mas recentemente, genes mediados por plasmídeos foram detetados [78]–[82]. Tendo em conta que a administração de colistina é realizada como último recurso de tratamento e uma vez que já foi detetado a presença do gene *mcr-1* mediado por plasmídeo em Portugal [105]–[109], foram pesquisados inicialmente genes do tipo *mcr* nos isolados resistentes à colistina.

A maioria (85.71%) dos isolados recolhidos mostrou resistência à colistina (grupo 2). Foi realizada a pesquisa dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* por estarem associados a plasmídeos, e portanto, promoverem uma disseminação mais rápida, sendo que o resultado foi negativo para todos os isolados analisados.

No entanto, em Portugal já foi detetado a presença do gene *mcr-1* mediado por plasmídeo em vários isolados de diferentes origens, quer de origem animal, quer em contexto hospitalar: (1) em *Salmonella enterica* isolada de amostras alimentares de origem animal [105]; (2) *Salmonella* em amostras clínicas, animais de consumo e água [106]; (3) em *E. coli* num paciente internado na unidade de terapia intensiva no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, Aveiro, [107]; (4) em *E.coli* e *K. pneumoniae* em suínos [108], e (5) em *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases em pacientes hospitalizados no Centro Hospitalar do Porto [109], alertando assim, para uma ameaça à saúde pública. Neste estudo confirma-se que a resistência à colistina nestes isolados não é mediada por genes *mcr*, e consequentemente por plasmídeos, e portanto, terá origem cromossômica.

Posteriormente foi analisado o gene cromossômico *mgrB*, uma vez que a inativação através de numerosas mutações (*nonsense*, *missence*, eliminação, inativação insercional) do gene *mgrB* parece ser o mecanismo de resistência à colistina mais frequente encontrado em *K. pneumoniae* [74], [126]. Os resultados mostraram que em 25% (6/24) dos isolados resistentes à colistina se verificou a amplificação de uma sequência de inserção de inativação. Isto leva à inativação de *mgrB*, um gene que codifica uma proteína transmembranar reguladora cuja produção é induzida após a ativação do sistema de sinalização PhoP-PhoQ, e que exerce um *feedback* negativo no mesmo sistema [77], que leva à modificação do lipopolisacarídeo (LPS) bacteriano, o alvo da colistina. Tendo em conta que houve a amplificação de uma sequência de inserção que leva à inativação de *mgrB*, MgrB deixou de exercer um feedback negativo ao sistema de sinalização PhoP-PhoQ. A regulação positiva do sistema de sinalização PhoP-PhoQ ativa o sistema de modificação do LPS, e é responsável pela resistência à colistina [77].

Uma vez identificada a causa responsável pela resistência à colistina de 25% dos isolados com resistência à colistina, ficaram por analisar os isolados restantes. Dado que inativação do gene *mgrB* e a presença de genes de resistência associados a plasmídeos (*mcr*) já foram analisados, o próximo passo seria analisar outros genes associados à resistência à colistina. Para além dos genes do tipo *mcr* e *mgrB*, um grande painel de genes e operões está envolvido na modificação qualitativa do LPS, incluindo genes e operões que codificam enzimas que estão diretamente envolvidas nas modificações do LPS (genes responsáveis pela síntese de grupos catiónicos e/ou a sua adição ao LPS), isto é, o gene *pmrC*, o gene *pmrE* e o operão *pmrHFIJKLM*; genes reguladores, tais como os que codificam proteínas envolvidas nos sistemas de dois componentes PmrAB e PhoPQ; e o sistema regulador de dois componentes *crrAB* recentemente descrito, que regula o sistema PmrAB [71].

Por fim, será útil realizar a tipagem molecular dos isolados por MLST, para se avaliar a relação clonal destes. A compreensão da relação clonal entre as estirpes microbianas é essencial para determinar a origem e as rotas das infeções, confirmar ou excluir surtos, traçar a transmissão cruzada de patógenos associados à saúde, reconhecer estirpes particularmente virulentas e avaliar a eficácia das medidas de controlo. A tipagem

bacteriana também contribuiu bastante para aumentar a eficácia dos sistemas de vigilância e fornecer pistas importantes para as estratégias de controlo da saúde pública [86].

5. CONCLUSÃO GERAL

A resistência aos antibióticos é um problema global e representa uma ameaça para os cuidados de saúde aos pacientes. No presente estudo, mostramos resistência a antibióticos mediada por β -lactamases, inclusive aos carbapenemos e resistência a colistina em isolados clínicos de *K. pneumoniae* de pacientes admitidos no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra e Centro Hospitalar Médio Tejo, em Portugal.

Este estudo mostra pela primeira vez a existência de *bla*_{OXA-181} (variante da carbapenemase OXA-48) em isolados nosocomiais *K. pneumoniae* em dois hospitais portugueses (central e distrital) e a permanência de *K. pneumoniae* produtor de KPC-3 no CHUC, já anteriormente descrito neste hospital. O gene *bla*_{OXA-181} apresentou-se inserido possivelmente no cromossoma ou em plasmídeos conjugativos cujo grupo Inc não foi possível determinar, sugerindo diversidade nas plataformas genéticas.

Verificamos também a alta prevalência de ESBLs nos isolados *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases, nomeadamente do tipo SHV, CTX-M e TEM, amplamente encontradas em *K. pneumoniae*.

Não existe um ST associado à *bla*_{OXA-181} a circular em Portugal. O ST associado à KPC-3 continua a circular no hospital desde 2013.

O facto de se observar resistência à colistina em *K. pneumoniae*, é um dado muito preocupante uma vez que limita as opções terapêuticas contra *K. pneumoniae*. Contudo, a resistência encontrada não está associada a genes *mcr* localizados em plasmídeos, o que pode limitar a disseminação desta resistência.

Mais estudos são necessários para investigar a localização genética dos genes de β -lactamase e esclarecer os mecanismos de resistência a colistina presentes nos isolados *K. pneumoniae* do presente estudo.

O presente estudo demonstra a necessidade de se controlar os doentes admitidos nos hospitais, especialmente os transferidos de outras unidades clínicas, e melhorar a vigilância epidemiológica da resistência aos antibióticos para conter a sua disseminação.

6. REFERÊNCIAS

- [1] R. M. Martin and M. A. Bachman, “**Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae***,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 8, no. January, pp. 1–15, 2018.
- [2] L. Xu, X. Sun, and X. Ma, “**Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae***,” *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [3] P. Y. Chung, “**The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation**,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 363, no. 20, pp. 1–6, 2016.
- [4] A. Mairi, A. Pantel, A. Sotto, J. P. Lavigne, and A. Touati, “**OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches**,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 37, no. 4, pp. 587–604, 2017.
- [5] L. K. Logan and R. A. Weinstein, “**The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace**,” *J. Infect. Dis.*, vol. 215, no. Suppl 1, pp. S28–S36, 2017.
- [6] A. P. R. Wilson, “**Sparing carbapenem usage**,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 72, no. 9, pp. 2410–2417, 2017.
- [7] N. Gupta, B. M. Limbago, J. B. Patel, and A. J. Kallen, “**Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention**,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 53, no. 1, pp. 60–67, 2011.
- [8] B. Tornimbene, S. Eremin, M. Escher, J. Griskeviciene, S. Manglani, and C. L. Pessoa-Silva, “**WHO Global antimicrobial resistance surveillance system early implementation 2016-17** . 2018.
- [9] R. I. Aminov, “**A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future**,” *Front. Microbiol.*, vol. 1, no. DEC, pp. 1–7, 2010.
- [10] A. J. Alanis, “**Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era?**,” *Arch. Med. Res.*, vol. 36, no. 6, pp. 697–705, 2005.
- [11] H. Barroso, A. Meliço-Silvestre, and N. Taveira, **Microbiologia médica**, Lidel-Ed. 2014.
- [12] G. Kaufman, “**Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance**,” *Nurs. Stand.*, vol. 25, no. 42, pp. 49–55, 2011.
- [13] J. C. Stuart, G. Voets, J. Scharringa, A. C. Fluit, and M. A. Leverstein-Van Hall, “**Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with a commercial DNA microarray**,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 61, no. 6, pp. 809–812, 2012.
- [14] a. S. Fauci, “**Infectious Diseases: Considerations for the 21st Century**,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 32, no. 5, pp. 675–685, 2001.
- [15] B. Rönnerstrand and V. Lapuente, “**Corruption and use of antibiotics in regions of Europe**,” *Health Policy (New York)*, vol. 121, no. 3, pp. 250–256, 2017.
- [16] F. Prestinaci, P. Pezzotti, and A. Pantosti, “**Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon**,” *Pathog. Glob. Health*, vol. 109, no. 7, pp. 309–318, 2015.
- [17] M. Eterna da Costa and H. S. Machado, “**Evolution of antimicrobial resistance in Europe: a**

factual review,” *J. Allergy Ther.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2017.

- [18] H. Grundmann *et al.*, “**A framework for global surveillance of antibiotic resistance,**” *Drug Resist. Updat.*, vol. 14, no. 2, pp. 79–87, 2011.
- [19] A. Huttner *et al.*, “**Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 world healthcare-associated infections forum,**” *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, vol. 2, no. 1, p. 31, 2013.
- [20] D. M. Livermore and D. M. Livermore, “**Introduction: the challenge of multiresistance,**” *Int J Antimicrob Agents*, vol. 29 Suppl 3, pp. S1–S7, 2007.
- [21] A. K. Van der Bij and J. D. D. Pitout, “**The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*,**” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, no. 9, pp. 2090–2100, 2012.
- [22] J. Davies and D. Davies, “**Origins and evolution of antibiotic resistance,**” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 74, no. 3, pp. 417–433, 2010.
- [23] K. Forsberg, A. Reyes, B. Wang, E. Selleck, M. Sommer, and G. Dantas, “**The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens,**” *Science (80-.)*, vol. 337, no. August, pp. 1107–1111, 2012.
- [24] E. Meyer, P. Gastmeier, M. Deja, and F. Schwab, “**Antibiotic consumption and resistance: data from Europe and Germany,**” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 303, no. 6–7, pp. 388–395, 2013.
- [25] K. Bockstael and A. Van Aerschot, “**Antimicrobial resistance in bacteria,**” *Cent. Eur. J. Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 141–155, 2009.
- [26] G. D. Wright, “**Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification,**” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 10, pp. 1451–1470, 2005.
- [27] Y. Cag, H. Caskurlu, Y. Fan, B. Cao, and H. Vahaboglu, “**Resistance mechanisms,**” *Ann. Transl. Med.*, vol. 4, no. 17, pp. 326–326, 2016.
- [28] H. Yoneyama and R. Katsumata, “**Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development,**” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 70, no. 5, pp. 1060–1075, 2006.
- [29] A. Giedraitienė, A. Vitkauskienė, R. Naginienė, and A. Pavilonis, “**Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria,**” *Medicina (Kaunas)*, vol. 47, no. 3, pp. 137–46, 2011.
- [30] J. M. Munita, C. A. Arias, A. R. Unit, and A. De Santiago, “**Mechanisms of antibiotics resistance,**” *Mech. Antibiot. Resist.*, vol. 4, no. 2, pp. 1–37, 2016.
- [31] K. Poole, “**Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance,**” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 92, no. s1, p. 55S–64S, 2002.
- [32] A. R. Burmeister, “**Horizontal gene transfer,**” *Evol. Med. Public Heal.*, vol. 2015, no. 1, pp. 193–194, 2015.
- [33] L. S. Frost, R. Leplae, A. O. Summers, and A. Toussaint, “**Mobile genetic elements: The agents of open source evolution,**” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 9, pp. 722–732, 2005.
- [34] S. M. Soucy, J. Huang, and J. P. Gogarten, “**Horizontal gene transfer: building the web of life,**” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 16, no. 8, pp. 472–482, 2015.
- [35] L. B. Rice, “**Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones,**” *Symp. Antimicrob. Ther.*, vol. 87, no. 2, pp. 198–208, 2012.
- [36] B. G. Hall and M. Barlow, “**Revised Ambler classification of β -lactamases,**” *J. Antimicrob.*

Chemother., vol. 55, no. 6, pp. 1050–1051, 2005.

- [37] K.-F. Kong, L. Schneper, and K. Mathee, “**Beta-lactam antibiotics: from antibiotics to resistance and bacteriology**,” *Apmis*, vol. 118, no. 1, pp. 1–36, 2010.
- [38] K. Bush and G. A. Jacoby, “**Updated functional classification of β -lactamases**,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 3, pp. 969–976, 2010.
- [39] P. R. Ambler, “**The structure of β -lactamases**,” *Philos. Trans. R. Soc. B*, vol. 289, no. 1036, pp. 321–331, 1980.
- [40] H. Öztürk, E. Ozkirimli, and A. Özgür, “**Classification of beta-lactamases and Penicillin Binding Proteins using ligand-centric network models**,” *PLoS One*, vol. 10, no. 2, pp. 1–23, 2015.
- [41] D. van Duin and Y. Doi, “**The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae***,” *Virulence*, vol. 8, no. 4, pp. 460–469, 2017.
- [42] C. A. Moxon and S. Paulus, “**Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* infections in children**,” *J. Infect.*, vol. 72, pp. S41–S49, 2016.
- [43] G. M. Voets, A. C. Fluit, J. Scharringa, J. Cohen Stuart, and M. A. Leverstein-Van Hall, “**A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases**,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 37, no. 4, pp. 356–359, 2011.
- [44] D. Rawat and D. Nair, “**Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria**,” *J. Glob. Infect. Dis.*, vol. 2, no. 3, p. 263, 2010.
- [45] A. Poulou *et al.*, “**Modified CLSI extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among *Enterobacteriaceae* producing various β -lactamases**,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 1483–1489, 2014.
- [46] Y. Chong, Y. Ito, and T. Kamimura, “**Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae***,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 11, no. 7, pp. 1499–1504, 2011.
- [47] S. Shaikh, J. Fatima, S. Shakil, S. M. D. Rizvi, and M. A. Kamal, “**Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment**,” *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 90–101, 2015.
- [48] R. Cantón and T. M. Coque, “**The CTX-M β -lactamase pandemic**,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 9, no. 5, pp. 466–475, 2006.
- [49] E. M. Saliu, W. Vahjen, and J. Zentek, “**Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in poultry**,” *Anim. Heal. Res. Rev.*, vol. 18, no. 1, pp. 46–57, 2017.
- [50] H. Ejaz, Ikram-ul-Haq, S. Mahmood, A. Zafar, and M. M. Javed, “**Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: comparison of phenotypic characterization methods**,” *Pakistan J. Med. Sci.*, vol. 29, no. 3, pp. 768–772, 2013.
- [51] Clinical and Laboratory Standards Institute, “**Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement**,” vol. 33, no. 1. 2014.
- [52] Y. K. Tsai, C. H. Liou, C. P. Fung, J. C. Lin, and L. K. Siu, “**Single or in combination antimicrobial**

resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, pp. 1–8, 2013.

- [53] M. N. D. Balm, G. Ngan, R. Jureen, R. T. P. Lin, and J. W. P. Teo, “OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* establishing in Singapore,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 13, no. 1, 2013.
- [54] P. Nordmann *et al.*, “Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 18, no. 5, pp. 432–438, 2012.
- [55] N. Stoesser *et al.*, “Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [56] J. D. Lutgring and B. M. Limbago, “The problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* detection,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 54, no. 3, pp. 529–534, 2016.
- [57] A. Potron, P. Nordmann, E. Lafeuille, Z. Al Maskari, F. Al Rashdi, and L. Poirel, “Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 10, pp. 4896–4899, 2011.
- [58] P. Wang *et al.*, “Occurrence of false positive results for the detection of carbapenemases in carbapenemase-negative *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates,” *PLoS One*, vol. 6, no. 10, pp. 6–10, 2011.
- [59] A. Cheruvanky *et al.*, “Enhanced *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) expression from a novel Tn4401 deletion,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, no. 6, pp. 1–29, 2017.
- [60] R. S. Arnold, K. a Thom, S. Sharma, M. Phillips, J. K. Johnson, and D. J. Morgan, “Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)- producing bacteria,” *South Med J.*, vol. 104, no. 1, pp. 40–45, 2011.
- [61] T. Palzkill, “Metallo- β -lactamase structure and function,” *NIH Public Access*, pp. 91–104, 2013.
- [62] Y. Khosravi, S. T. Tay, and J. Vadivelu, “Analysis of integrons and associated gene cassettes of metallo- β -lactamase-positive *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 60, no. 7, pp. 988–994, 2011.
- [63] J. M. Rolain, P. Parola, and G. Cornaglia, “New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic?,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 16, no. 12, pp. 1699–1701, 2010.
- [64] D. Yong *et al.*, “Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 12, pp. 5046–5054, 2009.
- [65] D. L. Paterson and R. A. Bonomo, “Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, no. 4, pp. 657–686, 2005.
- [66] Y. Pfeifer *et al.*, “Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 4, pp. 2125–2128, 2012.
- [67] V. Miriagou, G. Cornaglia, M. Edelstein, I. Galani, C. G. Giske, and M. Gniadkowski, “Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 16, pp. 112–122, 2010.
- [68] P. Nordmann, T. Naas, and L. Poirel, “Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 17, no. 10, pp. 1791–1798, 2011.

- [69] D. Girlich, L. Poirel, and P. Nordmann, **"Value of the modified hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*,"** *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 2, pp. 477–479, 2012.
- [70] G. L. Hara *et al.*, **"Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: recommendations from an international working group,"** *J. Chemother.*, vol. 25, no. 3, pp. 129–140, 2013.
- [71] L. Poirel, A. Jayol, and P. Nordmann, **"Polymyxins antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes,"** *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 30, no. 2, pp. 557–596, 2017.
- [72] A. Cannatelli *et al.*, **"McrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin,"** *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. July, pp. 5696–5703, 2014.
- [73] P. Srinivas and K. Rivard, **"Polymyxin resistance in Gram-negative pathogens,"** *Curr. Infect. Dis. Rep.*, vol. 19, no. 11, pp. 7–9, 2017.
- [74] S. Baron, L. Hadjadj, J. M. Rolain, and A. O. Olaitan, **"Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns,"** *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 48, no. 6, pp. 583–591, 2016.
- [75] H. Giamarellou, **"Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens,"** *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 48, no. 6, pp. 614–621, 2016.
- [76] C. R. MacNair *et al.*, **"Overcoming *mcr-1* mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics,"** *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018.
- [77] A. Cannatelli *et al.*, **"In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mcrB* regulator,"** *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 11, pp. 5521–5526, 2013.
- [78] Y. Y. Liu *et al.*, **"Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study,"** *Lancet Infect. Dis.*, vol. 16, no. 2, pp. 161–168, 2015.
- [79] B. B. Xavier *et al.*, **"Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2* , in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016,"** *Euro Surveill.*, vol. 21, no. 27, p. 30280, 2016.
- [80] W. Yin *et al.*, **"Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*,"** *MBio*, vol. 8, no. 3, 2017.
- [81] A. Carattoli *et al.*, **"Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli* , Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016,"** *Eurosurveillance*, vol. 22, no. 31, p. 30589, 2017.
- [82] M. Borowiak, J. Fischer, J. A. Hammerl, R. S. Hendriksen, I. Szabo, and B. Malorny, **"Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B,"** *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 72, no. 12, pp. 3317–3324, 2017.
- [83] K. Jeannot, A. Bolard, and P. Plésiat, **"Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms,"** *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 49, no. 5, pp. 526–535, 2017.

- [84] R. Urwin and M. C. J. Maiden, "Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology," *Trends Microbiol.*, vol. 11, no. 10, pp. 479–487, 2003.
- [85] A. J. Sabat *et al.*, "Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance," *Eur. Commun. Dis. Bull.*, vol. 18, no. 4, p. 20380, 2013.
- [86] R. Ranjbar, A. Karami, S. Farshad, G. M. Giammanco, and C. Mammina, "Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide," *New Microbiol.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–15, 2014.
- [87] W. Li, D. Raoult, and P. E. Fournier, "Bacterial strain typing in the genomic era," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 33, no. 5, pp. 892–916, 2009.
- [88] S. L. Foley, A. M. Lynne, and R. Nayak, "Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 9, no. 4, pp. 430–440, 2009.
- [89] F. Adzitey, N. Huda, and G. R. R. Ali, "Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks," *3 Biotech*, vol. 3, no. 2, pp. 97–107, 2013.
- [90] T. Lin, L. Lin, and F. Zhang, "Review on molecular typing methods of pathogens," *Open J. Med. Microbiol.*, vol. 4, no. 3, pp. 147–152, 2014.
- [91] A. Carattoli, "Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 301, no. 8, pp. 654–658, 2011.
- [92] A. Carattoli *et al.*, "In silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 7, pp. 3895–3903, 2014.
- [93] A. Carattoli, A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall, "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing," *J. Microbiol. Methods*, vol. 63, no. 3, pp. 219–228, 2005.
- [94] A. Carattoli, "Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 6, pp. 2227–2238, 2009.
- [95] M. Couturier, F. Bex, P. L. Bergquist, and W. K. Maas, "Identification and classification of bacterial plasmids," *Microbiol. Rev.*, vol. 52, no. 3, pp. 375–395, 1988.
- [96] R. P. Novick, "Plasmid incompatibility," *Microbiol. Rev.*, vol. 51, no. 4, pp. 381–395, 1987.
- [97] N. Mendonça, J. Leitão, V. Manageiro, E. Ferreira, and M. Caniça, "Spread of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 6, pp. 1946–1955, 2007.
- [98] S. Correia *et al.*, "High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* isolates among hemodialysis patients in Portugal: Appearance of ST410 with the *bla*CTX-M-14 gene," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 74, no. 4, pp. 423–425, 2012.
- [99] D. Jones-Dias, V. Manageiro, E. Ferreira, D. Louro, and M. Caniça, "Diversity of extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates from portuguese health care facilities," *J. Microbiol.*, vol. 52, no. 6, pp. 496–503, 2014.
- [100] V. Calhau, L. Boaventura, G. Ribeiro, N. Mendonça, and G. J. Da Silva, "Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolated from renal transplanted patients: virulence markers,

- extended-spectrum β -lactamases, and genetic relatedness,**” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 79, no. 3, pp. 393–395, 2014.
- [101] V. Manageiro, E. Ferreira, M. Pinto, and M. Caniça, “**First description of oxa-48 carbapenemase harbored by *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from a single patient in Portugal,**” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 12, pp. 7613–7614, 2014.
- [102] F. Calisto, C. Caneiras, S. Cerqueira, L. Lito, J. Melo-Cristino, and A. Duarte, “**Carbapenemase KPC-3 em estirpes de *Klebsiella pneumoniae* numa unidade hospitalar,**” *Rev. Port. Doenças Infecc.*, vol. 8, no. February 2014, pp. 127–134, 2012.
- [103] C. Rodrigues, J. Bavlovic, E. Machado, J. Amorim, L. Peixe, and Â. Novais, “**KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN),**” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. JUN, 2016.
- [104] D. Vubil, R. Figueiredo, T. Reis, C. Canha, L. Boaventura, and G. J. Da Silva, “**Outbreak of KPC-3-producing ST15 and ST348 *Klebsiella pneumoniae* in a Portuguese hospital,**” *Epidemiol. Infect.*, vol. 145, no. 3, pp. 595–599, 2016.
- [105] R. Figueiredo *et al.*, “**Detection of an *mcr-1*-encoding plasmid mediating colistin resistance in *Salmonella enterica* from retail meat in Portugal,**” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 71, no. 8, pp. 2338–2340, 2016.
- [106] J. Campos, L. Cristino, L. Peixe, and P. Antunes, “**MCR-1 in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- and *S. Rissen* clones in Portugal, 2011 to 2015,**” *Eurosurveillance*, vol. 21, no. 26, pp. 1–5, 2016.
- [107] M. Tação *et al.*, “***mcr-1* and *bla*KPC-3 in *Escherichia coli* sequence type 744 after meropenem and colistin therapy, Portugal,**” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 8, pp. 1419–1421, 2017.
- [108] N. Kieffer, M. Aires-de-Sousa, P. Nordmann, and L. Poirel, “**High rate of MCR-1–producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among pigs, Portugal,**” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 12, pp. 2023–2029, 2017.
- [109] A. C. Mendes *et al.*, “***mcr-1* in carbapenemase-producing in hospitalized patients, Portugal, 2016–2017,**” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 4, pp. 2016–2017, 2018.
- [110] EUCAST, “**Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters,**” *Eur. Comm. Antimicrob. Susceptibility Test.*, pp. 0–77, 2018.
- [111] D. C. Vubil, “**Dissertação de Mestrado. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* β -lactamases from patients admitted at the University Hospital of Coimbra, Portugal,**” Universidade de Coimbra, 2015.
- [112] L. Poirel, C. Héritier, V. Tolün, and P. Nordmann, “**Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*,**” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 1, pp. 15–22, 2004.
- [113] L. Diancourt, V. Passet, J. Verhoef, a D. Patrick, P. a D. Grimont, and S. Brisse, “**Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates,**” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, no. 8, pp. 4178–4182, 2005.

- [114] A. R. Marra *et al.*, “Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: Impact of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence,” *BMC Infect. Dis.*, vol. 6, pp. 1–8, 2006.
- [115] M. E. Falagas and D. E. Karageorgopoulos, “Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms,” *J. Hosp. Infect.*, vol. 73, no. 4, pp. 345–354, 2009.
- [116] C. Duvernay, L. Coulanges, B. Dutilh, V. Dubois, C. Quentin, and C. Arpin, “Duplication of the chromosomal *bla*SHV-11 gene in a clinical hypermutable strain of *Klebsiella pneumoniae*,” *Microbiology*, vol. 157, no. 2, pp. 495–503, 2011.
- [117] J. Heritage, F. H. M’Zali, D. Gascoyne-Binzi, and P. M. Hawkey, “Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 44, no. 3, pp. 309–318, 1999.
- [118] M. T. Nüesch-Inderbinen, F. H. Kayser, and H. Hächler, “Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, no. 5, pp. 943–949, 1997.
- [119] A. Liakopoulos, D. Mevius, and D. Ceccarelli, “A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. SEP, 2016.
- [120] M. M. D’Andrea, F. Arena, L. Palleschi, and G. M. Rossolini, “CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 303, no. 6–7, pp. 305–317, 2013.
- [121] M. Y. Lee, K. S. Ko, C. I. Kang, D. R. Chung, K. R. Peck, and J. H. Song, “High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 38, no. 2, pp. 160–163, 2011.
- [122] L. Poirel, P. Nordmann, S. Ducroz, H. J. Boulouis, P. Arné, and Y. Millemann, “Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type ST274 in companion animals,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 5, pp. 2372–2375, 2013.
- [123] C. R. Lee, J. H. Lee, K. S. Park, Y. B. Kim, B. C. Jeong, and S. H. Lee, “Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. JUN, pp. 1–30, 2016.
- [124] B. Kitchel *et al.*, “Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 8, pp. 3365–3370, 2009.
- [125] G. Peirano and J. D. D. Pitout, “Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 35, no. 4, pp. 316–321, 2010.
- [126] K. Novovic, A. Trudic, S. Brkic, Z. Vasiljevic, M. Kojic, and D. Medic, “Molecular epidemiology of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, no. 5, pp. 1–6, 2017.

7. ANEXOS

Anexo 1: Sequências dos *primers* usados na detecção de β -lactamases

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Annealing</i>	<i>Amplicação (pb)</i>	<i>Referência</i>
TEM-F	TACGATACGGGAGGGCTTAC	56°C	716	Mendonça et al., 2007
TEM-R	TTCCTGTTTTTGCTCACCCA			
SHV-F	TCAGCGAAAAACACCTTG		471	
SHV-R	TCCCGCAGATAAATCACCA			
CTX-F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	52°C	543	Poirel et al., 2004
CTX-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA			
OXA-48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG		733	
OXA-48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC			
KPC-F	TATCGCCGTCTAGTTCTGCTGCT	62°C	871	Vubil, D., 2014
KPC-R	ACTGCCCCGTTGACGCCCAAT			

Anexo 2: Sequências dos *primers* usados na detecção de genes de resistência à colistina

Primer	Sequência	Annealing	Amplicação (pb)	Referência
mcrB_ext-F mcrB_ext-R	AAGGCGTTCATTCTACCACC TTAAGAAGGCCGTGCTATCC	54°C	144	Cannatelli et al., 2013
Mcr-1-F Mcr-1-R	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC CTTGGTCGGTCTGTA GGG	54°C	309	Liu et al., 2015
Mcr-2-R Mcr-2-R	TGTTGCTTGTGCCGATTGGA AGATGGTATTGTTGGTTGCTG	54°C	567	Xavier et al., 2016
Mcr-3-F Mcr-3-R	TGCTGAACCAATCCCATTAC ATCACGCCACCAGATTACTG	54°C	174	Presente estudo
Mcr-4-F Mcr-4-R	ATTGGGATAGTCGCCTTTTT TTACAGCCAGAATCATTATCA	54°C	487	Carattoli et al., 2017
Mcr-5-F Mcr-5-F	CAGACGAAGCAAGGGAAGTC TGATCGGAAACGTACAGCAG	54°C	727	Presente estudo

Anexo 3: Sequências dos *primers* usados em MLST de *K. pneumoniae* (Diancourt et al, 2005).

Primer	Sequência	Annealing	Amplicão (pb)
rpoB-F rpoB-R	GGCGAAATGGCWGAGAACCA GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	50°C	501
gapA-F gapA-R	TGAAATATGACTCCACTCACGG CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	60°C	450
mdh-F mdh-R	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	50°C	477
pgi-F pgi-R	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	50°C	432
phoE-F phoE-R	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	50°C	420
infB-1F infB-1R	CTCGCTGCTGGACTATATTCG CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	50°C	318
tonB-1F tonB-1R	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	45°C	414

Anexo 4: Sequências dos *primers* usados na detecção de plasmídeos do grupo Inc (Carattoli et al., 2005).

Primer	Sequência	Amplicação (pb)
HI1 FW	5-ggagcgatggattacttcagtac-3	471
HI1 RV	5-tgccgtttcacctcgtgagta-3	
HI2 FW	5-tttctcctgagtcacctgttaacac-3	644
HI2 RV	5-ggctcactaccgtgtcatcct-3	
I1 FW	5-cgaaagccggacggcagaa-3	139
I1 RV	5-tcgtcgttccgccaagttcgt-3	
X FW	5-aaccttagaggctatttaagttgctgat-3	376
X RV	5-tgagagtcaattttatctcatgttttagc-3	
L/M FW	5-ggatgaaaactatcagcatctgaag-3	785
L/M RV	5-ctgcaggggcgattcttagg-3	
N FW	5-gtctaacgagcttaccgaag-3	559
N RV	5-gttcaactctgccaagttc-3	
FIA FW	5-ccatgctggttctagagaaggtg-3	462
FIA RV	5-gtatatccttactggctccgcag-3	
FIB FW	5-ggagttctgacacacgattttctg-3	702
FIB RV	5-ctcccgctcgcttcagggcatt-3	
W FW	5-cctaagaacaacaaagcccccg-3	242
W RV	5-ggtgcgcggcatagaaccgt-3	
Y FW	5-aattcaaacaacactgtgcagcctg-3	765
Y RV	5-gcgagaatggacgattacaaaacttt-3	
P FW	5-ctatggccctgcaaacgcgccagaaa-3	534
P RV	5-tcacgcgccagggcgagcc-3	
FIC FW	5-gtgaactggcagatgaggaagg-3	262
FIC RV	5-ttctcctcgtcgccaaactagat-3	
A/C FW	5-gagaaccaaagacaaagacctgga-3	465
A/C RV	5-acgacaaacctgaattgcctcctt-3	
T FW	5-ttggcctgtttgtgcctaaaccat-3	750
T RV	5-cgttgattacacttagcttggac-3	
FII _S FW	5-ctgtcgtgaagctgatggc-3	270
FII _S RV	5-ctctgccacaaacttcagc-3	
F _{repB} FW	5-tgatcgtttaaggaatttg-3	270
F _{repB} RV	5-gaagatcagtcacaccatcc-3	
K/B FW	5-gcgggccggaaagccagaaaac-3	160
K RV	5-tctttcacgagcccgcctaaa-3	
B/O RV	5-tctgcgttccgccaagttcga-3	159

